

**A FITOKRÓMB FOTORECEPTOR SZEREPE A NÖVÉNYI  
CIRKADIÁN ÓRA ÉS RITMUSOK SZABÁLYOZÁSÁBAN**

**Ph.D. értekezés**

**Palágyi Andrea**

**Témavezető: Dr. Kozma-Bognár László**

**Biológia Doktori Iskola, SZTE TTIK  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**2011**

**Szeged**

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. BEVEZETÉS.....	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1. BIOLÓGIAI RITMUSOK.....	7
2.1.1. A cirkadián ritmusok jellemzői.....	7
2.1.2. A cirkadián óra.....	9
2.1.3. A cirkadián óra általános felépítése, óraelemek és definíciók.....	9
2.1.4. A növényi cirkadián óra felépítése.....	12
2.1.4.1. Az "input" oldal.....	12
2.1.4.2. Az oszcillátor .....	15
2.1.4.3. Az "output" oldal.....	159
2.1.5. A cirkadián óra jelentősége .....	20
2.2. NÖVÉNYI FOTORECEPTOROK.....	22
2.2.1. Fitokrómok .....	22
2.2.2. Kriptokrómok.....	34
2.2.3. UV-B receptorok.....	35
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	37
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....	38
4.1. Kísérleti anyagok és organizmusok .....	38
4.1.1. Vegyszerek .....	38
4.1.2. Tápladatok és táptalajok, antibiotikumok .....	38
4.1.3. Plazmid konstrukciók .....	39
4.1.4. Baktériumok .....	39
4.1.5. Növények.....	40
4.1.6. Fénykezelések.....	40
4.2. Molekuláris biológiai módszerek.....	40
4.2.1. Plazmid DNS tisztítás (Sambrook és mtsai, 1989).....	40
4.2.2. Növényi genomiális DNS tisztítás .....	41
4.2.3. DNS hasítása restrikciós endonukleázokkal, ligálás, baktérium-transzformáció ....	41
4.2.4. Agrobacterium konjugáció .....	42
4.2.5. Össz-RNS izolálás .....	42
4.2.6. cDNS szintézis RT-PCR-hoz .....	43

4.2.7. <i>Western-blot</i> .....	43
4.2.8. <i>Kromofór-kötés vizsgálata</i> .....	44
4.3. <i>Növényeken alkalmazott technikák</i> .....	44
4.3.1. <i>Magsterilizálás, növénynevelés</i> .....	44
4.3.2. <i>Transzgenikus növények előállítása (Clough és Bent, 1998)</i> .....	44
4.3.3. <i>In vivo lumineszcencia-mérés luminométerrel (Millar és mtsai, 1992)</i> .....	45
4.3.4. <i>Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával</i> .....	46
4.3.5. <i>Periódushossz adatok számolása</i> .....	46
4.3.6. <i>Hipokotilhossz mérése</i> .....	47
4.3.7. <i>Virágzási idő meghatározása</i> .....	47
4.3.8. <i>Fény, fluoreszcens és konfokális mikroszkópia</i> .....	47
5. EREDMÉNYEK.....	49
5.1. Az N-terminális PHYB fragmentumok szerkezete, kifejeződése és sejten belüli elhelyezkedése .....	49
5.2. Az egyes PHYB-változatok eltérő módon komplementálják a <i>phyB-9</i> növények fotomorfogenikus és virágzási idő fenotípusát.....	53
5.3. A <i>phyB-9</i> mutáció hatása a központi óraelemek ritmikus kifejeződésére.....	55
5.4. A különböző PHYB-változatok cirkadián funkciójának vizsgálata állandó vörös fényben.....	58
5.5. A PHYB által közvetített vörös fény pulzusok hatása az óra beállítására .....	60
5.6. A B410-NLS fúziós fehérje a PHYB receptor kromofór kötésére képtelen, inaktív változata .....	62
5.7. A PHYB hatása az órára folyamatos fehér fényben .....	63
6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.....	65
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	72
8. SUMMARY.....	75
9. PUBLIKÁCIÓS LISTA .....	80
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	81
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	95

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>AD</b>	activator domain = aktivátor domén
<b>BD</b>	binding domain = kötő domén
<b>bHLH</b>	bázikus “hélix loop hélix” motívum
<b>BLD</b>	bilin liáz domén
<b>BRASS</b>	Biological Rhythms Analysis Software System
<b>CCD</b>	charge coupled device
<b>CCT</b>	“contans/contans-like/timing of cab 1” motívum
<b>Col-0</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Columbia-0 ökotípus
<b>cps</b>	count per seconds = 1 másodperc alatt beérkező fotonok száma
<b>EE</b>	evening element = esti elem
<b>EDTA</b>	etilén-diamin-tetraacetát
<b>FMN</b>	flavin-mononukleotid
<b>FRC</b>	fluence rate curve
<b>FRP</b>	free-running period = szabadon futó periódus
<b>GFP</b>	green fluorescent protein = zöld fluoreszcens protein
<b>LD</b>	light/dark cycles = fény/sötét ciklusok
<b>LFR</b>	low fluence response
<b>LOV</b>	light/oxygen/voltage domén
<b>LRE</b>	light-responsive element = fény-válasz elem
<b>NBs</b>	nuclear bodies
<b>NES</b>	nuclear exclusion signal = sejtmagi export jel
<b>NLS</b>	nuclear localization signal = sejtmagi lokalizációs jel
<b>OD</b>	optikai denzitás
<b>PAS</b>	Per/Arnt/Sim domén
<b>P<sub>fr</sub></b>	a fitokróm távoli vörös fényt abszorbeáló konformerje
<b>pPCV</b>	plant cloning vector = növényi klónozó vektor
<b>P<sub>r</sub></b>	a fitokróm vörös fényt abszorbeáló konformerje
<b>PRC</b>	phase responsive curve
<b>SCF</b>	Skip/Cullin/F-box
<b>SDS</b>	nátrium-dodecil-szulfát
<b>SEM</b>	standard error mean
<b>TRIS</b>	trisz(hidroximetil)amino-metán (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )
<b>UV-A/B</b>	ultraibolya-A/B sugárzás
<b>VLFR</b>	very low fluence response
<b>Ws</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Wassilevskija ökotípus
<b>WT</b>	vad típusú növény
<b>YFP</b>	yellow fluorescent protein = sárga fluoreszcens protein
<b>ZT</b>	zeitgeber time

## GÉNSZIMBÓLUMOK

<b>CAB</b>	CHLOROPHYLL A/B-BINDING = klorofill A/B-kötő
<b>CCA1</b>	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
<b>CCR2</b>	COLD CIRCADIAN CLOCK REGULATED 2
<b>CK2</b>	CASEIN KINASE 2
<b>COP1</b>	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1
<b>CPRF2</b>	COMMON PLANT REGULATORY FACTOR 2
<b>CRY</b>	CRYPTOCHROME = kriptokróm

<b>DET1</b>	DE-ETIOLATED 1
<b>ELF</b>	EARLY FLOWERING
<b>EPR1</b>	EARLY PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1
<b>FHY</b>	FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL
<b>FT</b>	FLOWERING LOCUS T
<b>GI</b>	GIGANTEA
<b>LHY</b>	LATE ELONGATED HYPOCOTYL
<b>LUC</b>	<i>Photinus pyralis</i> (szentjánosbogár) luciferáz
<b>NPH</b>	NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL
<b>PER</b>	PERIOD
<b>PHOT</b>	PHOTOTROPIN = fototropin
<b>PHY</b>	PHYTOCHROME = fitokróm
<b>PIF</b>	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
<b>PIL</b>	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE
<b>PRR</b>	PSEUDO RESPONSE REGULATOR
<b>TIC</b>	TIME FOR COFFEE
<b>TOC1</b>	TIMING OF CAB 1
<b>WC-1</b>	WHITE COLLAR 1
<b>ZTL</b>	ZEITLUPE

## 1. BEVEZETÉS

A növényi cirkadián óra magját az ún. óragének és az általuk kódolt órafelhérjék alkotják, amelyek összekapcsolódó genetikai hálózatokat alkotva szabályozzák önmaguk és egymás kifejeződését. E reguláció eredményeképp alakul ki a kb. 24 h periódussal (cirkadián: *circa dien* = kb. egy nap) rendelkező oszcilláció elsődlegesen az egyes órakomponensek mennyiségében. A ritmikus jel megfelelő átviteli rendszereken keresztül számos életfolyamat számára kölcsönöz napi ritmicitást. Az óra működése révén a különböző folyamatokat arra a napszakra időzíti, mikor azokra a leginkább szükség van. Kísérleti eredmények bizonyítják, hogy az óra által biztosított időbeli szervezettség elomlása jelentősen visszaveti az élőlények, így a növények fejlődését is. A precíz időzítés érdekében az órának a környezettel (külső idő) összhangban kell működnie. A szinkronizációt (vagy beállítást) a napi periodicitást mutató környezeti jelek segítik, amelyek közül a leghatékonyabb a fény (nappalok-éjszakák váltakozása). A fény hatása az órára – azaz a beállítás – az alkalmazott körülményektől függően eltérő folyamatokban nyilvánul meg. Folyamatos fényben az óra szabadonfutó periódushossza fordítottan arányos a fény intenzitásával. Más szavakkal kifejezve, a fény gyorsítja az óra működését. Ezt a jelenséget parametrikus beállításnak nevezzük. Ha viszont a növényeket folyamatos sötétben tartjuk és rövid fénypulzusokkal világítjuk meg őket, az eredeti szabadonfutó ritmus fázisa változik meg. A kialakuló fáziscúszás iránya és nagysága az alkalmazott fénykezelés dóziséjától és időpontjától függ. Ezt a jelenséget nem-parametrikus beállításnak nevezzük. Természetes körülmények között, vagyis a nappalok és éjszakák váltakozása során, e két beállító mechanizmus eredőjeként valósul meg a szinkronizáció az óra fázisa (szubjektív idő) és a környezet (objektív idő) között.

A fényt speciális fotoreceptorok abszorbeálják, majd a jeleket az órakomponensekhez továbbítják, amelyek megváltoztatása révén az óra beállítása végül megtörténik. A pontos molekuláris mechanizmus, vagyis az a folyamat, amelynek során az órakomponensek fényindukált módosítása az oszcilláció sebességének és/vagy fázisának megváltozásához vezet, még nem ismert. Az óra beállítása szempontjából a kék fényt elnyelő kriptokróm és a vörös/távoli vörös fényt abszorbeáló fitokróm fotoreceptorok bírnak jelentőséggel. Megjegyzendő, hogy ezek a receptorok nemcsak a cirkadián órát látják el fény-jelekkel, hanem szabályozzák a fotomorfogenezis (a növények fényfüggő egyedfejlődése) élettani és fejlődési folyamatait, valamint a virágzás indukcióját is.

A fényen nőtt növények egyik legfontosabb fotoreceptora a fitokróm B (PHYB), amely vörös fény-függő módon szabályozza az órát, a fotomorfogenezis folyamatait és a virágzás indukcióját *Arabidopsis*-ban. A PHYB különböző szabályozási folyamatokban betöltött szerepe miatt a *phyB* mutánsok meglehetősen sokféle fenotípust mutatnak. Folyamatos vörös fényben a cirkadián ritmusok periódusa hosszabb, a vörös fénypulzusra adott fázisválasz pedig kisebb mértékű a mutáns növényekben. A receptor hiányában kevesebb fényjel jut a fotomorfogenezis szabályozó folyamataihoz is, ezért a *phyB* mutáns növények hipokotilja és levélnyele is megnyúlt. A PHYB gátló, késleltető szerepet játszik a virágzás indukciójában, ezért a *phyB* mutánsok korábban virágoznak, mint a megfelelő vad típusú növények.

Munkánk során a PHYB szerepét vizsgáltuk elsődlegesen az óra szabályozása szempontjából, de az előállított kísérleti anyag vizsgálata új információkat szolgáltatott a receptor fotomorfogenikus és virágzást szabályozó funkciójáról is.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. BIOLÓGIAI RITMUSOK

A ritmicitás általános és változatos jelenség a biológiai rendszerekben, amely a szerveződés különböző szintjein jelenik meg. Biológiai ritmusnak nevezzük azokat az élő szervezetekben lejátszódó folyamatokat, amelyek megjelenésében bizonyos ismétlődés, periodicitás figyelhető meg.

Ultradián (latinul *ultra diem* = kevesebb mint egy nap) ritmusoknak nevezzük azokat a biológiai ritmusokat, amelyekre rövid periódusidejű oszcilláció jellemző, a megfigyelt folyamat egy nap alatt többször megismétlődik. Például a hipokotil a cirkumnutációs mozgás során néhány óra alatt tesz egy kört, némely ionfelvételi folyamat 8-10 óra alatt ismétlődik. A biokémiai, metabolikus öfenntartó oszcillációk ritmusa igen gyors, egy ciklus ideje néhány perc (például a glikolitikus oszcillátor élesztőben). Az infradián (*infra diem* = több mint egy nap) ritmusok periódushossza több mint egy nap. Ide sorolható a főemlősök 25-35 naponként ismétlődő menstruációs ciklusa. A leghosszabb biológiai ritmusok az ún. cirkannuális ritmusok, amelyek éves ismétlődést mutatnak, mint pl. a téli álmot alvó állatok nyugalmi időszaka. A cirkadián (*circa diem* = közel egy nap) ritmusok periódushossza közelítőleg 24 óra. A Föld tengely körüli forgásának idejével közel megegyező periódusú folyamatok és jelenségek rendkívül általánosak az élővilágban a prokariótáktól az eukariótákig.

A ritmicitás háttérében álló óramechanizmus az utóbbi évtizedben sok részletében tisztázódott a molekuláris biológia eszköztárának felhasználásával. A következőkben a növényi biológiai óra mechanizmusának fiziológiai és molekuláris alapjaiba szeretnék betekintést nyújtani.

#### 2.1.1. A cirkadián ritmusok jellemzői

A cirkadián ritmusok jellemző vonásait, a többi biológiai ritmustól megkülönböztető jegyeit az alábbi pontokban foglalhatjuk össze (Edmunds, 1988):

1. A cirkadián ritmusok periódushossza megközelítőleg 24 óra. Ciklikusan változó körülmények között (pl. fény/sötét vagy hőmérséklet ciklusokon) a periódushossz (bizonyos határokon belül) megegyezik a külső ciklus periódushosszával. Ilyenkor a külső környezet ritmikus változása vezérli az oszcillációt. Állandó körülmények között azonban (pl. állandó fény- és hőmérsékletviszonyok mellett), amikor a ritmikus folyamat tovább folytatódik (legalábbis egy ideig), kialakul a cirkadián



ritmusokra jellemző saját periódushossz, amely közelítőleg, bár soha nem pontosan 24 óra. Az ilyen ritmust szabadon futó ritmusnak (free running period = FRP) nevezzük.

2. Bár a ritmusok endogén karakterűek, igénylik a környezeti szignált. Ha a szervezet egy ideig konstans körülmények között van és hiányzik az indító környezeti jel, a ritmus kifárad, azaz csökken az amplitúdója.
3. A cirkadián ritmusok változó környezeti tényezőkkel állíthatók be. A beállítás (entrainment) az a folyamat, amelynek során a belső ritmus időzítése (szubjektív idő) szinkronba kerül a külső környezettel (objektív idő). A cirkadián szabályozás akkor igazán előnyös a szervezet számára, ha a belső óra által mért idő megfelel a valós környezetben mérhető időnek. A cirkadián órát beállító legfontosabb tényezők a fény/sötét átmenet ill. a meleg/hideg szakaszok periódikus váltakozása. Ezeket a szignálokat időjelzőnek (Zeitgeber) nevezzük.
4. A cirkadián ritmusok állandó körülmények között is fennmaradnak, az adott ritmusra ill. az adott organizmusra jellemző FRP-t mutatva.
5. Állandó körülmények a természetben nem tapasztalhatók, csak laboratóriumi körülmények között valósíthatók meg. Ugyanakkor a rendszer igen hasznos eszköznek bizonyult a cirkadián ritmusok kutatásában, mivel ilyen körülmények mellett a külső környezeti hatások elhanyagolhatók és a ritmus jellegét egyedül annak belső törvényszerűségei alakítják ki. Ilyen egyszerűsített vizsgálati rendszerben, a szabadon futó ritmusok tanulmányozásával könnyebben megérthetjük a cirkadián szabályozásban résztvevő molekuláris mechanizmusokat.
6. A cirkadián ritmusok hőmérsékletkompenzáltak, azaz a cirkadián ritmus periódushossza nem vagy csak kis mértékben változik a környezet hőmérsékletének bizonyos határok közötti változására. A biokémiai folyamatok sebességének hőmérsékletfüggését az ún. Q10 értékkel jellemezhetjük, amely kifejezi, hogy egy adott folyamat sebessége hányszorosára növekszik, ha a hőmérsékletet 10 °C-kal emeljük. Míg az átlagos biokémiai folyamatok Q10 értéke általában 2-4 közötti, a cirkadián ritmusok periódushossza csak kis mértékben változik a hőmérséklet változtatásával. Ezt a jelenséget hőmérséklet-kompenzációnak nevezzük.

### 2.1.2. A cirkadián óra

Cirkadián órának nevezzük azt a bonyolult belső időmérő mechanizmust, amely a cirkadián ritmusok létrehozásában, fenntartásában és irányításában vesz részt. Mivel folyamatos fényben vagy sötétben a cirkadián ritmus nem érzékeli közvetlenül a fény és sötét jelenlétét vagy hiányát, egyértelmű, hogy egy belső, önfenntartó irányítónak kell lennie. A cirkadián óra egy molekuláris óra, amelynek elemeit gének és azok termékei alkotják. A cirkadián órák működésének alapja egy endogén, önfenntartó, negatív visszacsatolás (feedback loop), amelyben pozitívan és negatívan ható faktorok (órafelhérjék) kölcsönös, transzkripció és transláció szintű szabályozása vesz részt, amelynek eredményeképpen kialakul a közelítőleg 24 órás periódus. Az általános modell szerint a ciklus kezdetén egy pozitív faktor megindítja a negatív faktorokat kódoló gének átírását. Ugyanakkor az egyre nagyobb mennyiségben termelődő negatív faktorok gátolják a pozitív faktorok aktiváló hatását, vagyis saját génjük átíródását, ezáltal mennyiségük csökken, így a pozitív elemek aktiváló hatása ismét érvényesülhet. A cirkadián órák működésének és a 24 órás periódushossz kialakításának alapvető feltétele a késleltetés, amelynek révén az egyes órafelhérjék mennyisége csak a megfelelő óragén indukciója után több órával éri el a maximumát. Ennek hiányában a szabályozó ciklus jóval rövidebb idő alatt futna körbe, mint egy nap. A késleltetés kialakításában bizonyos poszt-transzlációs mechanizmusok vesznek részt, szabályozva az óraelemek aktivitásának ill. degradációjának sebességét, kialakítva ezzel a viszonylag hosszú, közel 24 órás periódushosszt.

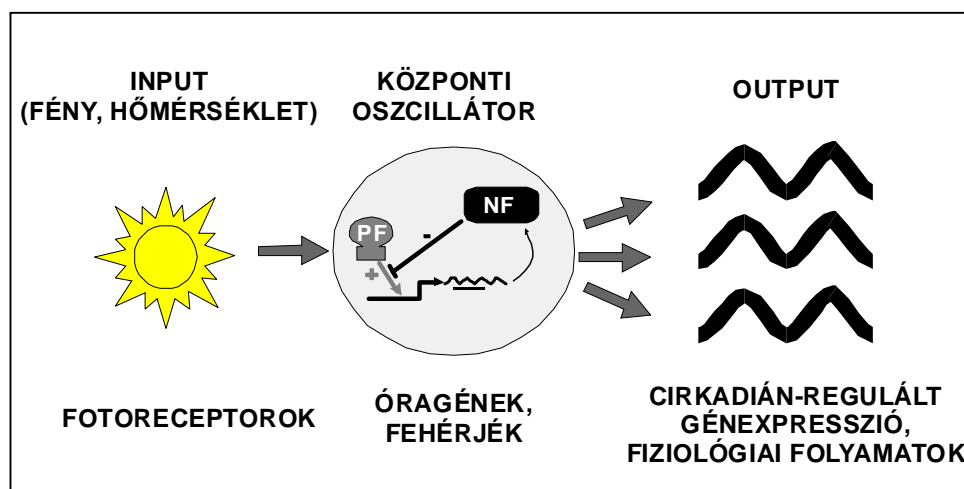
### 2.1.3. A cirkadián óra általános felépítése, óraelemek és definíciók

A cirkadián óra vázlatos szerkezetét és működését a **2.1. ábra** szemlélteti (Morrow és mtsai, 1997, Johnson és mtsai, 1998). Az óra három fő részből épül fel:

1. Az bemenő (input) oldal a szinkronizáló jeleket továbbítja az oszcillátor felé, amelyek közül a legfontosabbak a fény és a hőmérséklet. A fény-jelet speciális fotoreceptorok érzékelik és bonyolult jelátviteli úton közvetítik a hatást az óra központja felé.
2. A központi oszcillátor egy olyan mechanizmus, amely a külső környezettől függetlenül képes oszcilláció létrehozására és fenntartására. Az oszcillátor elemei (az ún. óragének ill. órafelhérjék) negatív visszacsatolás útján szabályozzák

önmaguk és egymás kifejeződését, működését. Meg kell említeni, hogy a környezeti paraméterek periódikus változásai nem szükségesek a ritmus kialakításához és fenntartásához, de hatással vannak az oszcilláció periódushosszára, fázisára és amplitúdójára.

3. A kimeneti (output) oldal tartalmazza mindazon folyamatokat, amelyekre az oszcilláció hatást gyakorol. Itt találhatók az óra által szabályozott gének, biokémiai vagy fiziológiai folyamatok.



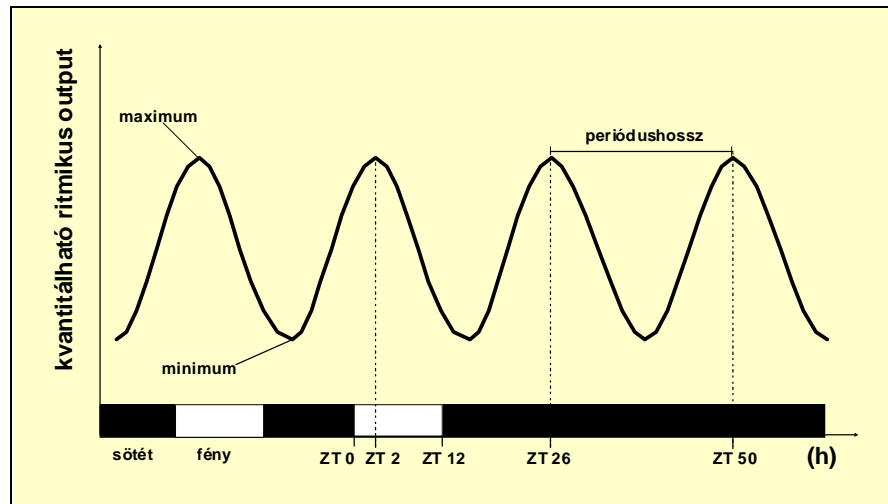
**2.1 ábra. Az eukarióta cirkadián rendszerek vázlata**

Az oszcillátor ritmusának fázisát a környezeti paraméterek (fény, hőmérséklet) periódikus váltakozása állítja be (input elemek). A központi oszcillátor működési mechanizmusa önfenntartó negatív visszacsatoláson alapul. A pozitív faktor (PF) indukálja a negatív faktort (NF) kódoló gén átírását, a fokozatosan emelkedő mennyiségű NF pedig idővel gátolja a PF aktiváló hatását. Így az NF mennyisége csökkenni kezd, gátló hatása gyengül, majd meg is szűnik, és ezzel egy újabb ciklus veszi kezdetét. Az oszcillátor által ritmikus jel egy több ágon futó jelátviteli láncon keresztül szabályozza az output elemek ritmikus működését.

Az alábbi kritériumok valamennyi modellszervezet cirkadián órájára általánosan jellemzőek:

1. Az „input” elemek mutációja megváltoztatja az óra beállíthatóságát, érzékenységét a környezeti tényezőkre. A bemeneti oldal mutációja leggyakrabban az óra periódushosszában, amplitúdójában vagy fázisában okoz zavart, szélsőséges esetben aritmiát is okozhat.
2. A központi oszcillátor óraelemeit érintő mutációk hatása megnyilvánulhat aritmiában, vagy fázis-, amplitúdó-, ill. periódushossz-változásban is.
3. Az „output” elemek nem hatnak vissza az órára, így mutációjuk csak az adott elem ill. az általa szabályozott folyamatok működését zavarja. A kimeneti elemek sérülése nem okoz az óra periódushosszában változást.

A cirkadián ritmusokat számos paraméterrel jellemzzük, melyeket legegyszerűbben egy ritmus sematikus ábrája segítségével érthetünk meg (2.2. ábra). A grafikon a ritmikus folyamat valamely paraméterét ábrázolja az idő függvényében és feltünteti az órát jellemző fogalmakat is.



**2.2 ábra. A cirkadián ritmusok fontosabb paraméterei.**

Az ábrán egy cirkadián óra által szabályozott gén kifejeződésének mértékét, pontosabban az adott génről átíródott mRNS molekulák mennyiségét tüntettük fel az idő függvényében. A kísérletben alkalmazott fényviszonyokat fekete (sötét) ill. fehér (fény) sávokkal jelöltük. Látható, hogy a gén kifejeződése minden nap a fény bekapcsolása után kb. 2 órával éri el a maximumát. A váltakozó sötét/fény körülmények mellett az oszcilláció kb. 24 órás periódust mutat. Ez a ritmus aztán is folytatódik, hogy a rendszert a vizsgálat harmadik napjától állandó sötétbe helyeztük, szemléltetve a cirkadián ritmusok diagnosztikai jellegét. (A fogalmak magyarázata az alábbi szövegben található.)

- Periódushossznak nevezzük az ismétlődő ciklusban két összehasonlítási pont közötti, időben kifejezhető távolságot. A cirkadián ritmusok esetében a periódushossz közel 24 óra.
- A fázis kifejezést használjuk a ciklus egyes pontjainak jelölésére, órákban kifejezve. A legfontosabb fázispontok a maximum és a minimum értékek.
- A cirkadián ritmus amplitúdója a minimum és a maximum pont közötti távolság fele. Ez gyakran változik, miközben a periódus maga változatlan marad.

Az amplitúdó definíciója a szakirodalomban kétféle. A biológiában két mérhető határérték közötti távolság, fizikában a szinuszosan változó mennyiség maximális értéke, tehát a biológiai definíció szerinti mennyiség  $\frac{1}{2}$ -ed része. Az újabb szakirodalom egy része a fizikai definíciót használja.

d. ZT (Zeitgeber time) alatt az órát beállító utolsó környezeti szignált értjük, órákban kifejezve. Ha a környezeti beállító jel a fény, akkor  $ZT = 0$  az az időpont, amikor a szervezet az állandó körülmények beállta előtti utolsó sötét-fény átmenetet (utolsó hajnal) érzékelte. A ZT kifejezést a laboratóriumokban konstans körülmények között végzett kísérletek során alkalmazzuk, mivel a természetben nem léteznek állandó körülmények. Természetes környezetben az óra minden reggel, a fényszakasz kezdetén újra beállítódik, így ilyenkor a ZT skála csak  $ZT = 0$ -tól  $ZT = 24$ -ig tart.

e. Szubjektív nappalnak (ill. szubjektív éjszakának) nevezzük azt az időtartamot, amely a belső óra által jelzett nappali (ill. éjszakai) szakasznak felel meg, az órát beállító ciklusoknak megfelelően, állandó körülmények között végzett kísérletekben. A szubjektív hajnal tehát a környezetben bekövetkező sötét-fény átmenet időpontja, de a kísérletben alkalmazott állandó fényviszonyok mellett nem kíséri valós sötét-fény változás, csak az óra által jelzett hajnali időpontot jelenti.

#### **2.1.4. A növényi cirkadián óra felépítése**

A növényi cirkadián óra működését először növényekben fedezték fel (de Marian, 1729), azonban a működés molekuláris mechanizmusáról még néhány évvel ezelőtt is meglehetősen kevés adat állt rendelkezésünkre. Az oszcillátor működéséről nyert legtöbb információ kéalgákon (*Synechococcus* sp.), gombákon (*Neurospora crassa*), ecetmuslicákon (*Drosophila melanogaster*) és egereken (*Mus musculus*) végzett kísérletekből származik (Harmer és mtsai, 2001). A növényi cirkadián szabályozás folyamata legjobban az *Arabidopsis thaliana*-ban jellemzett, bár számos leírást találunk a *Pharbitis nil*, *Kalanchoe* és *Phaseolus* fajok cirkadián ritmusairól is (Bünning, 1935; Lumsden és mtsai, 1995; Engelmann és Johnsson, 1998; Borland és mtsai, 1999).

Az alábbiakban a növényi cirkadián rendszer működését mutatom be a klasszikus óramodell alapján felvázolva.

##### **2.1.4.1. Az „input”oldal**

A cirkadián rendszer megfelelő működéséhez a belső biológiai óra által mért időnek azonos fázisban kell lennie a környezetben mérhető valós idővel. A cirkadián ritmusok

periódushossza nem pontosan 24 óra, ezért az óra fázisa rendszeresen beállításra szorul. A biológiai órának mindennap újra és újra történő beállítása az ún. “resetting”.

Az óra beállításában résztvevő két legfontosabb környezeti tényező a fény és a hőmérséklet (Edmunds, 1988; Roenneberg és Foster, 1997). A fény abszorpciójában és a jel továbbításában a fitokróm (PHY) és kriptokróm (CRY) fotoreceptorok játszanak szerepet (Somers és mtsai, 1998; Devlin és Kay, 2000), a hőmérséklet hatásmechanizmusáról még kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az óra beállítása molekuláris szinten azt a folyamatot jelenti, amely során a környezeti jel hatására valamely központi óraelem mennyisége vagy aktivitása megváltozik a ciklus egyik pontján, és az így kialakult egyensúlyban az oszcillátor a ciklus egy másik pontjára jellemző állapotba kerül (Crosthwaite és mtsai, 1995). Ennek eredményeképpen az óra fázisa megváltozik.

Az óra és a fény kapcsolata azonban nem merül ki a fény fázisra gyakorolt hatásában, a cirkadián óra a 24 órás ciklus folyamán nem egyformán válaszol a ritmust átállító fénykezelésekre. Ugyanis a szubjektív hajnal előtt adott fényimpulzus a ritmus fázisát előre hozza („phase advance”), a szubjektív este után alkalmazott fénykezelés pedig a fázist későbbre tolja („phase delay”), míg szubjektív nappal során az óra csak minimális fáziscúszással válaszol az órát beállító fényimpulzusokra. Az ún. phase response curve (PRC) ábrázolja a fénykezelés hatására kialakult új fázisnak a nem fénykezelt minták fázisához viszonyított pozitív vagy negatív eltérését a fénykezelés időpontjának (ZT) függvényében (Johnson, 1990). Az óra fényfüggő beállíthatóságának mértéke a nap folyamán cirkadián görbe szerint változik, mivel az óra fázis-specifikusan gátolja a fényimpulzusra adott válaszreakció erősségét. Ez a jelenség az ún. gating (kapu mechanizmus). Tudjuk, hogy a fény a fotoreceptorokon keresztül, az órát kikerülve közvetlenül is képes egyes óragének kifejeződését szabályozni, amelyet akut válasznak nevezünk. A „gating” mechanizmus révén a cirkadián óra képes az akut válasz mértékét fázis-specifikusan gátolni, azaz az óra képes a fázisának megfelelően csökkenteni vagy növelni az adott folyamat fényérzékenységét, így a gátló hatás maga is cirkadián ritmust mutat.

## A fény „input” jelátviteli lánc elemei

A fényreceptoroktól az oszcillátor felé induló jelátviteli lánc elemeit még nem sikerült egyértelműen azonosítani. Az eddig leírt elemek közül csak néhánynak vizsgálták a cirkadián „input” folyamatokban betöltött szerepét.

A fitokrómok által szabályozott folyamatok közül az egyik legfontosabb a génexpresszió közvetlen szabályozása transzkripciós faktorok közreműködésével, amelyet a fitokrómokkal kölcsönható fehérjékkel történt vizsgálatokkal bizonyítottak. A PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) volt az elsőként azonosított PHYB-vel kölcsönható fehérje. (Ni és mtsai, 1988). A PIF3 egy bHLH típusú transzkripciós faktor, amely az aktív fitokróm molekulával összekapcsolódva kötődik számos fényindukált gén promóterének ún. G-box szekvenciájához, és szabályozza ezeknek a géneknek a kifejeződését (Martinez-Garcia és mtsai, 2000). A PIF3 fehérje *in vivo* körülmények között szerepet játszik a *CCA1* és *LHY* óragének kifejeződésének fényregulációjában. Azonban bizonyos eredmények szerint a PIF3 túltermelése ill. funkcióvesztéssel járó mutációja nem változtatja meg a cirkadián ritmusok periódushosszát, és az óra vörös fénnel történő beállíthatósága is normális marad (Viczián és mtsai, 2005). Továbbá a *PIF3* transzkripciója csak igen alacsony amplitúdójú cirkadián ritmust mutat. Ezek alapján a PIF3 szerepe az óra működésében nem nagyon jelentős, ami persze nem zárja ki, hogy a fotoreceptorok a sejtmagban más transzkripciós faktorokhoz kötődve szabályozzák a *CCA1/LHY* óraelemek kifejeződését, ami az óra átállításához vezet (Yamashino és mtsai, 2003).

A ZEITLUPE (ZTL) egy három tagból álló fehérjecsalád tagja, ide tartoznak még a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) és a FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) fehérjék, melyek három funkcionális doménnel rendelkeznek (Light, Oxigen, Voltage (LOV) domén, F-box motívum és Kelch repeat domén). A LOV domén a Period-ARNT-Sim (PAS) fehérjemotívum egyik altípusa (Somers, 2001), ezért a ZTL fehérje LOV/PAS doménjeként nevezik. A különböző fehérjékben előforduló PAS domének egyik típusa a protein-protein kölcsönhatásokban vesz részt, a másik a környezeti jelek érzékelésében játszik szerepet. A ZTL géncsalád tagjai által kódolt fehérjék funkciója tehát a fehérjék fényszabályozott degradációjának irányítása lehet. A *ZTL* gén mutációja a cirkadián ritmusok periódushossz-növekedését okozza (Somers és mtsai, 2000). A mutáns cirkadián fenotípusának megnyilvánulása a fényintenzitás függvényében változik, amiből

arra következtethetünk, hogy a ZTL a fény „input” jelátviteli lánc egyik eleme, továbbá képes a PHYB és CRY1 fotoreceptorokkal összekapcsolódni (Jarillo és mtsai, 2001).

A GIGANTEA (GI; Fowler és mtsai, 1999; Park és mtsai, 1999) egy sejtmagi fehérje. A *GI* mRNS és fehérje mennyisége napi ritmusú oszcillációt mutat, maximuma este mérhető. A GI fehérje szerepe a cirkadián ritmusok amplitúdójának és periódushosszának szabályozása. A *GI* mutációi nem okoznak aritmiát (Park és mtsai, 1999), ezen kívül a GI fontos a vörös fény indukált jelátviteli folyamatokban.

Az EARLY FLOWERING 3 (ELF3) és EARLY FLOWERING 4 (ELF4) pozitív regulátora a hipokotilmegnyúlás fényszabályozott gátlásának. Az *elf3* és az *elf4* mutánsok rövidnappalon korán virágoznak, és fényben nevelve hosszabb a hipokotiljuk, mint a vad típusú növényeknek (Zagotta és mtsai, 1996; Doyle és mtsai, 2002; Khanna és mtsai, 2003). Az *elf3* növények sötétben a vad típushoz hasonló cirkadián ritmust mutatnak (Covington és mtsai, 2001), míg állandó fényben aritmiássá válnak (Hicks és mtsai, 1996). A mutáció a fotoreceptorok és az óra közti jelátvitelt érintheti (McWatter és mtsai, 2000). Állandó körülmények között vizsgált *elf4* növényeknél viszont minden esetben aritmia lép fel. Az ELF3 és ELF4 fehérjék a *CCA1* ill. *LHY* óragének megfelelő szinten történő kifejeződéséhez is nélkülözhetetlenek (Doyle és mtsai, 2002). A cirkadián óra szabályozza az *ELF3* és *ELF4* kifejeződését, mindamelllett az *ELF4* expressziója fénnel is indukálható. Az ELF3 és ELF4 konstitutívan a sejtmagban található (Liu és mtsai, 2001; Khanna és mtsai, 2003), ahol részt vesznek a de-etioláció, a fotoperiodizmus, valamint a cirkadián óra fény „input” folyamatainak szabályozásában.

#### **2.1.4.2. Az oszcillátor**

A növényi cirkadián oszcillátor sajátossága, hogy szinte valamennyi komponens az óra működésében betöltött funkciójától függetlenül szerepet játszik a fény jelátviteli utak és a fotomorfogenezis szabályozásában. Az *Arabidopsis*-ban leírt cirkadián oszcillátor három, egymással kapcsolt szabályozó hurokból épül fel. A központi hurok elemeit és működését már viszonylag régóta ismerjük, ezért részletesebben tárgyaljuk (Alabadí és mtsai, 2001).

A *CCA1* és *LHY* fehérjék egymással nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Mindkettő atipikus DNS-kötő fehérje, egy MYB-szerű domént tartalmaznak, amelynek egyetlen MYB struktúrája a szekvenciaspecifikus DNS-kötésért felelős. A MYB domén általában 1-3 ismétlődő MYB szekvenciát tartalmaz, amelyeken belül a fehérjelánc egy-egy ún. hélix-hurok-hélix szerkezetbe rendeződik (Stracke és mtsai, 2001). *Arabidopsis*-ban a MYB



domének többsége általában 2-3 MYB szekvenciát hordoz, és dimerek formájában kötődik a DNS-lánchoz (Romero és mtsai, 2001).

A CCA1 fehérje egy klorofill A/B-kötő (CHLOROXYLL A/B-BINDING = CAB) fehérjét kódoló gén promóterében található ún. fény-válasz elemhez (LRE) kötődik (Kenigsbuch és Tobin, 1995). Később kiderült, hogy a CCA1 a cirkadián óra egyik legfontosabb szabályozó eleme (Wang és Tobin, 1998).

Az *LHY* gén azonosításához egy olyan kísérlet vezetett, amelyben hosszú hipokotilú, későn virágzó *Arabidopsis* mutáns növényeket kerestek (Schaffer és mtsai, 1998). Az így azonosított mutánsban (*lhy-1*) az *LHY* gén magas szinten fejeződik ki. A CCA1 és az LHY fehérje által felismert DNS motívum az AAAATCT vagy az AAATATCT szekvencia. Utóbbit „esti elemnek” (EE = evening element) nevezzük, mivel olyan gének promóterében találták, amelyek cirkadián kifejeződése este éri el a maximumát (Harmer és mtsai, 2000). A CCA1 és LHY gének expressziója a cirkadián óra szabályozása alatt áll. Továbbá a mRNS és fehérje akkumuláció ritmusának maximumát a reggeli fázisban (ZT1) mérhetjük. A CCA1/LHY gének kifejeződése fénnel indukálható, ami arra utal, hogy ezek a gének részt vehetnek az óra fázisának fényindukált átállításában (phase resetting).

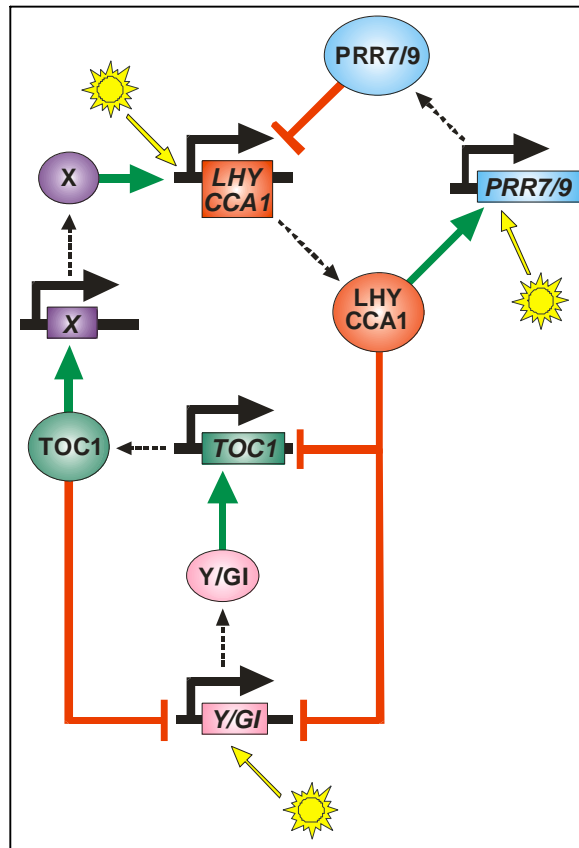
A két gén bármelyikének túltermeltetése a cirkadián óra által szabályozott folyamatok aritmiáját okozza (Wang és Tobin, 1998). A CCA1 és LHY fehérjét túltermelő növények későn virágoznak, és hosszabb hipokotillal rendelkeznek, mint a vad típusú növények. A két gén bármelyikének mutációja ugyanazon cirkadián ritmusok periódushosszának rövidülését okozza. Ezen kívül korai virágzást és hipokotilhossz rövidülést figyelhetünk meg a mutáns növényeknél (Green és Tobin, 1999; Mizoguchi és mtsai, 2002). Mindezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az LHY és CCA1 fehérjék nagyon hasonló szerepet töltenek be a cirkadián óra szabályozásában és a két protein között funkcionális redundancia áll fenn.

A központi szabályozó hurok harmadik eleme a *TOC1* gén ill. fehérje (Somers és mtsai, 1998; Strayer és mtsai, 2000). A TOC1 fehérje a bakteriális két-komponensű jelátviteli rendszerekben található ún. „response regulator” (RR) fehérjékhez (Mizuno, 1998). Azonban a TOC1 fehérjéből hiányzik az RR fehérjében megtalálható, foszforilálódó, konzervált aszparaginsav, így a TOC1 fehérjét PSEUDO RESPONSE REGULATOR 1 (PRR1) néven is ismerik. A fehérje a C-terminális végen egy ún. CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TIMING OF CAB 1 (CCT) motívumot is tartalmaz, amely a CONSTANS fehérjecsalád tagjaira jellemző (Robson és mtsai, 2001). A CCT motívum egy 45 aminosavból álló fehérjeszakasz, amelynek N-terminális vége egy nukleáris

lokalizációért felelős szekvenciát is hordoz. A TOC1 fehérjének kettős szerepe van: a fényjelet az oszcillátor felé közvetíti, és fontos szabályozó funkciója van a korai fotomorfogenezisben is (Somers és mtsai, 1998; Más és mtsai, 2003). A TOC1 fehérje vörös fényben nélkülözhetetlen eleme a központi oszcillátornak. A mutánsban megváltozik a hipokotilmegnyúlás szabályozása, és a mutáció hatására a növények korábban virágoznak, mint a vad típusú növények. A *TOC1* gén kifejeződése cirkadián ritmust mutat, esti (ZT13) maximummal (Strayer és mtsai, 2000). Promótere egy ún. esti elemet tartalmaz, amely a génkifejeződés cirkadián szabályozásához és az esti fázis kialakításához szükséges (Alabadí és mtsai, 2001). In vitro DNS-kötő vizsgálattal kimutatták, hogy a CCA1 és az LHY képes a *TOC1* gén promóteréhez kötődni. Megfigyelték, hogy a CCA1 ill. LHY fehérjét túltermelő növényekben a *TOC1* mRNS szintje nagyon alacsony volt, ami arra utal, hogy a növényekben a CCA1/LHY közvetlenül gátolja a *TOC1* transzkripcióját. A *toc1-1* mutáns növényekben a *CCA1* és *LHY* alacsonyabb szinten fejeződik ki, mint a vad típusú növényekben, ami megerősíti, hogy a TOC1 pozitív regulátora a CCA1 ill. LHY fehérjék kifejeződésének (Alabadí és mtsai, 2001). A TOC1 fehérje degradációját egy F-box fehérje, a ZEITLUPE (ZTL) fényfüggő módon irányítja (Más és mtsai, 2003). E kezdeti, elsődleges óramodell több lépésben változott, vált pontosabbá.

Locke és mtsai megfigyelték, hogy a *cca1 lhy* duplamutáns nagyon alacsony amplitúdóval és rövid periódussal jellemezhető cirkadián ritmust mutat. Mivel ebben a mutáns háttérben a CCA1/LHY-TOC1 hurok nem működhet, az adatok arra utaltak, hogy az növényi oszcillátor rendelkezik még legalább egy szabályozó hurokkal, amely CCA1 és LHY hiányában is képes öfenntartó ritmusok létrehozására. Matematikai modellek alapján azt jósolták, hogy a második szabályozó hurok a TOC1 és egy ismeretlen Y génből/fehérjéből épül fel. Mindkét komponens az esti órákban fejeződik ki, az Y faktor pozitívan szabályozza a *TOC1* gént, míg a TOC1 fehérje gátolja az Y gén transzkripcióját. A modell megjósolta az Y gén kifejeződésének mintázatát, valamint mutációjának hatását. Ezek alapján sikerült igazolni, hogy az Y faktor szerepét a *GIGANTEA (GI)* gén tölti be (Locke és mtsai, 2005). A matematikai modell kísérleti eredményekkel való összevetése rámutatott arra is, hogy a TOC1 fehérje valószínűleg nem közvetlenül szabályozza a *CCA1/LHY* géneket, hanem egy hipotetikus X faktoron keresztül. Ez magyarázná a jelentős időbeli eltérést a TOC1 fehérjék maximális mennyisége és a *CCA1/LHY* gének maximális transzkripciója között (Locke és mtsai, 2005).

A modell pontosításának utolsó lépéséhez az a megfigyelés vezetett, hogy a *toc1* null mutáns növényekben határozott cirkadián ritmus mérhető. A TOC1 közös komponense



**2.3. ábra. A növényi cirkadián oszcillátor modellje**

A géneket téglalapok, a fehérjéket ellipszisek, a pozitív hatásokat zöld, a gátlást piros szín jelöli. A sárga nyilak az adott gének fényindukált transzkripciójára utalnak.

mindkét korábban leírt szabályozó körnek, ezért mutációja esetén aritmia várható. Ezek az eredmények ismét arra utaltak, hogy egy további szabályozó kör vár felfedezésre. Ez 2006-ban következett be, mikor többszörös mutánsok, ill. túltermelő vonalak vizsgálatával kimutatták, hogy a harmadik szabályozó kört a CCA1/LHY valamint a PRR7 és PRR9 gének/fehérjék alkotják. A PRR7 és 9 fehérjék az ún. “pseudo response-regulator” fehérjék családjába tartoznak, csakúgy, mint a TOC1, amely a PRR1 nevet is viseli. A PRR7,9 fehérjék gátolják a CCA1/LHY gének kifejeződését, míg a CCA1/LHY fehérjék serkentik a PRR7,9 gének transzkripcióját (Locke és mtsai., 2006). A növényi oszcillátor sematikus modelljét a **2.3 ábra** mutatja. Az oszcillátor a fent leírt három összekapcsolt szabályozó körből áll. Az adott körök komponenseinek napszakos kifejeződése miatt a CCA1/LHY-PRR7,9 hurkot reggeli, míg a TOC1-GI kört esti szabályozó körnek nevezzük. Mutánsok vizsgálatával igazolták, hogy a reggeli és esti szabályozó körök önmagukban is képesek oszcilláció létrehozására, de ezen ritmusok periódusa jelentősen rövidebb a vad típusú óráénál. Ez azt jelenti, hogy a vad típusú növényekben mérhető kb. 24 órás periódus azáltal

alakul ki, hogy a két rövid periódusú hurok összekapcsolódik egymással a központi szabályozó körön keresztül. Mivel a *CCA1/LHY*, *PRR9* és *GI* gének transzkripciója fényindukált, gyakorlatilag mindhárom szabályozó hurok rendelkezik potenciális fénybemenettel, amelyen keresztül a különböző fotoreceptorok által továbbított fényjelek hatással lehetnek az egyes szabályozó körök működésére.

#### **2.1.4.3. Az „output” oldal**

A cirkadián ritmusok az élő szervezetek folyamatainak különböző szintjein figyelhetők meg. A kimeneti oldalon találjuk az óra által szabályozott géneket (melyek termékei nem hatnak vissza az órára), valamint fiziológiai folyamatokat.

A cirkadián óra számos gén kifejeződését szabályozza a transzkripció vagy a transláció szintjén. Ezek közül legismertebbek a klorofill a/b kötő fehérje (CAB) és a ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz-oxigenáz kis alegységét (RBCS) kódoló gének (Millar és Kay, 1991; Pilgrim és McClung, 1993). Magas szinten fejeződnek ki, így nem okoz nehézséget a megfelelő mRNS molekulák detektálása. A „microarray” technológiával lehetőség nyílt arra, hogy egy kísérleten belül, több ezer gén kifejeződéséről kapjunk információt. E kísérletek során megállapították, hogy az *Arabidopsis* genom közel 6%-a ritmikusan fejeződik ki, és az expressziós mintázatok között a legkülönbözőbb fázisú ritmusok is megtalálhatók (Harmer és mtsai, 2000; Schaffer és mtsai, 2001). A cirkadián módon expresszált gének egy csoportja a környezeti stresszhatásokra közvetlenül is reagál (Kreps és mtsai, 2002), továbbá e gének ritmikus kifejeződése felkészítheti a növényt az előre kiszámítható stresszhatásokra (pl. reggeli erős fény), így növelve a növény ellenállóképességét.

A génkifejeződés szintjén érvényesülő ritmusok végső soron a növény biokémiai és fiziológiai folyamataiban jelentkeznek. A legismertebb élettani folyamatok, amelyeket az óra irányít: a hipokotilmegnyúlás, a sziklevélmozgás és a virágzási idő.

A növényi óraműködés cirkadián ritmusát leggyakrabban a levélmozgással jellemzik (Engelmann és mtsai, 1994; Millar és mtsai, 1995). A növények levelei a nap folyamán jellegzetes mozgást mutatnak. Nappal a növények a levéllemezeit vízszintes helyzetbe fordítják, hogy minél nagyobb levélfelülettel biztosítsák a napenergia lehető leghatékonyabb felhasználását. Éjjel pedig ellenkezőleg, függőleges irányba helyezkednek. Ez a ritmikus folyamat a cirkadián óra irányítása alatt áll, mivel állandó fény- és hőmérsékleti körülmények között is fennmarad.

A hipokotilmegnyúlás napi ritmust mutat, ami szabadon futó körülmények között is megfigyelhető (Dowson-Day és Miller, 1999). A megnyúlás sebessége este éri el a maximumát, hajnalban pedig leáll a növekedés.

### **2.1.5. A cirkadián óra jelentősége**

Az élővilágban minden szerveződési szinten megfigyelhető a cirkadián szabályozás valamilyen formája. Az órának nagyon fontos szerepe van az életfolyamatok szabályozásában.

A cirkadián óra legfontosabb szerepe az lehet, hogy az adott szervezet számára mintegy előre jelzi a környezeti tényezők megváltozásának időpontját, így még azt megelőzően időben felkészülhet rá a szervezet. A cirkadián óra megjelenése tehát az evolúció során szelektív előnyt biztosított az élőlények számára. Az élővilág fejlődése során legalább négy különböző úton alakult ki hasonló szerkezetű óramechanizmus (Young és Kay, 2001). A közel 24 órás periódusú cirkadián reguláció igen fontos szerepet tölt be a változó környezethez történő alkalmazkodásban, működése adaptív előnyhöz juttatja az organizmust, növeli az élőlény életképességét és versenyképességét. A cirkadián óra az általa szabályozott folyamatokon keresztül felkészíti a szervezetet a megfelelő napszakhoz való alkalmazkodásra, ténylegesen nappali vagy éjszakai üzemmódba állítva azt. Az egyes folyamatok időbeli programozása, a megfelelő napszakra történő időzítése teszi lehetővé, hogy az egyébként inkompatibilis folyamatok azonos térben játszódhassanak le. Mint például a cianobaktériumokban a fotoszintézis és a nitrogénkötés folyamatának időbeli szétválasztása (Mitsui és mtsai, 1986). A növények energiaellátása szempontjából igen fontos, hogy a nappal során a fény, mint energia felhasználása maximális hatékonysággal történjen. Ehhez azonban nélkülözhetetlen, hogy a növény még napfelkelte előtt felkészüljön a fényenergia elnyelésére, és beindítsa a fotoszintézishez szükséges molekuláris folyamatokat (Kreps és Kay, 1997).

A cirkadián óra az adott inger és az ingerre adott válasz közé épülve megszünteti azok szigorú csatoltságát. Ezáltal gátolja a szervezetet abban, hogy a környezeti változásokra gyors, adekvát választ adjon. Ebből fakadóan azoknál a folyamatoknál, amelyeknél fontos a környezeti változásokra adott gyors válaszreakció, általában nem állnak a cirkadián óra szabályozása alatt.

Az óra másik fontos funkciója, az élőlények fotoperiodizmusának szabályozása. Amely lehetővé teszi az egyedek számára, hogy képesek legyenek alkalmazkodni az évszakok változásaihoz, és biztosítja a kedvezőtlen körülmények közötti túlélést (Thomas, 1998). A szezonális változások észlelése és ennek következtében a speciális folyamatok megfelelő időzítése szelektív előnyt biztosít a növény számára. A fotoperiodizmus kialakításában a cirkadián óra és a fény együttesen vesznek részt. A cirkadián óra és a fotoperiodizmus kapcsolatát tekintve, bizonyosnak tűnik, hogy a növények a fényszakasz hosszát a cirkadián óra segítségével „méri”. Erre utal az a tény is, hogy valamennyi óra-mutásban eltolódott a virágzási idő is.

A fotoperiodizmus, a virágzás indukciója speciálisan növényi jelenség (Lumsden, 1991; Thomas és Vince-Prue, 1996). Az ún. rövid nappalos (RN) növények naponta legalább 16 h sötétséget, a hosszú nappalos (HN) növények pedig naponta legalább 16 h fényt igényelnek a virágzás indukciójához. Egy HN növény RN körülmények között nem, vagy jelentősen később virágzik. A HN növények virágzását RN körülmények között indukálni lehet, ha a sötét szakasz bizonyos pontjain rövid, extra megvilágítást alkalmazunk. Ha a virágzás indukálhatóságának mértékét az idő függvényében ábrázoljuk, szabályos cirkadián ritmust mutat. Ez az jelenti, hogy a cirkadián óra határozza meg azokat a rövid intervallumokat, amelyekben a fény hatással van a virágzás indukciójára. A jövőben elképzelhető, hogy képesek leszünk az óra működését oly módon átállítani, hogy ezek az érzékeny szakaszok a rövid nappalos körülmények közötti fény periódusra essenek. Ilyenkor a HN növények RN fényviszonyok közt is virágoznának. Talán képesek lennénk megvalósítani, hogy a HN haszonnövények termesztése olyan területekre is kiterjedjen, ahol RN körülmények uralkodnak, vagy HN fényviszonyok között egy tenyészedőben több generáció termését is be lehessen takarítani.

A cirkadián óra fontos szerepet játszik a növények fejlődésében, növekedésében és a megfelelő morfológia kialakításában is. Paradicsommal (*Lycopersicon esculentum*) végzett kísérletek azt mutatták, hogy a növények rosszul fejlődnek, kicsik maradnak és kevés termést hoznak, ha állandó hőmérsékleten és fényen neveljük őket (Highkin és Hanson, 1954; Went, 1960). Ha viszont hideg/meleg termociklusokkal működésben tartjuk a cirkadián órát, állandó fényben is normálisan fejlődnek.

Az említett példák bebizonyították, hogy a cirkadián órának meghatározó jelentősége van az élőlények egyedfejlődésében, életképességében, valamint növelik túlélési esélyeit a különböző versenyhelyzetekben.

## 2.2. NÖVÉNYI FOTORECEPTOROK

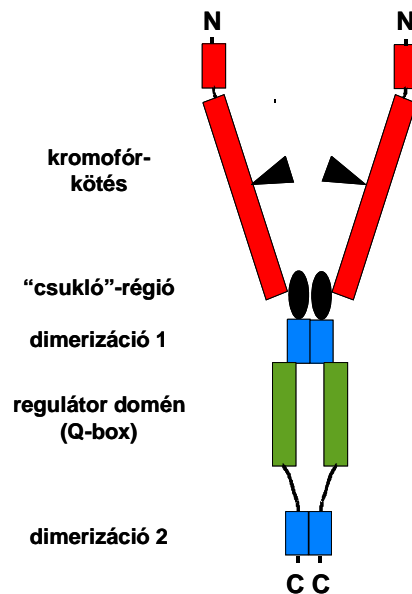
A fény a fotoszintetizáló zöld növények életében meghatározó környezeti tényező. A szárazföldi növények ideálisan alkalmazkodtak a fény teljesmértékű hasznosításához. A fényhez való genetikai adaptáció a filogenezis során ment végbe. A növények fejlődését, morfogenezisét a gének és a környezet – elsősorban a fény - együttesen határozza meg. A morfogenezis nem a fotoszintézis következménye, de a morfogenezisben bekövetkezett különbségek összefüggésben vannak a fénnel. A fény érzékelésében a növényekben speciális receptorfehérjék vesznek részt. Segítségükkel érzékelik a növények a fény hullámhosszát, intenzitását, beesésének irányát, így növekedési folyamataik megfelelhetnek a változó környezeti feltételeknek.

A növényi fotoreceptorokat fényelnyelésük, ill. hatásspektrumuk alapján 3 nagy csoportba osztjuk (Chen és mtsai, 2004):

1. A vörös/ távoli vörös fény érzékelésében résztvevő fitokrómok (Quail és mtsai, 1995).
2. Az UVA és kék fény tartományban elnyelő kriptokrómok és fototropin (Cashmore és mtsai, 1999; Lin és Shalitin, 2003; Briggs és mtsai, 2001; Lin, 2002).
3. Az UVB fotoreceptorok (Jansen, 2002).

### 2.2.1. Fitokrómok

A jelenleg ismert fény által szabályozott növényi életfolyamatok többsége a fitokróm fotoreceptorokon keresztül szabályozott. A fitokróm fotoreceptorok homodimer formában működnek a növényi sejtekben. A fitokróm holoprotein molekula két részből áll, az apoproteinből (125 kDa) és egy nem protein, fényabszorbeáló kromofór részből (fitokromobilin). A fitokromobilin egy nyílt láncú tetrapirrol, amely kovalensen kötődik a fitokróm apoproteinhez. A különböző apoproteinekből felépülő fitokróm receptorok nemcsak spektrális és biokémiai tulajdonságaikban térnek el egymástól, hanem diszkrét szabályozó funkciókat töltenek be. A fitokróm fotoreceptor holoprotein molekulájának vázlatos szerkezete a domének funkcionális megjelenítésével a **2.4. ábrán** látható.



2.4. ábra. A fitokrómok vázlatos szerkezete

Az N-terminális szakasz a kromofórkötés, így a fényabszorpció helye. A kromofór csoport egy konzervált helyzetű cisztein aminosav tioészter kötésen keresztül kapcsolódik az apoproteinhez. Az N-terminálison levő PEST (prolin-glutaminsav-szerin-treonin) szekvencia, közel a kromofór kötődési helyéhez, a fotodegradációért felelős. Ez a szekvencia a phyB típusú fitokrómból hiányzik. Az N-terminális részt egy proteáz-emésztésre különösen érzékeny szakasz köti össze a C-terminális résszel. Ez a régió tartalmazza az ún. regulátor domént (Q-box, Quail és mtsai, 1995). A C-terminálisban szintén található egy, a fotodegradációban szerepet játszó domén, amely az ubiquitin kötődésért felelős, és minden fitokróm típusban jelen van. A C-terminális fontos része a dimerizációért felelős domén is, amelyen keresztül két azonos típusú receptor fehérje/fehérje kölcsönhatás révén kapcsolódik egymással, homodimert alkotva. Összességében tehát a fitokróm molekula egy kétkomponensű szabályozó rendszer, amelyben az N-terminális az érzékelő, a C-terminális pedig a jelátvivő szerepét tölti be.

A fitokróm apoprotein a sejtmagban kódolt, míg a fitokromobilin a plasztiszban szintetizálódik 5-aminolevulinsavból kiindulva, a klorofill bioszintézis út leágazásaként. A fitokróm apoprotein és fitokromobilin végül a citoszolban autokatalitikusan egyesülnek funkcióképes holoproteinné.

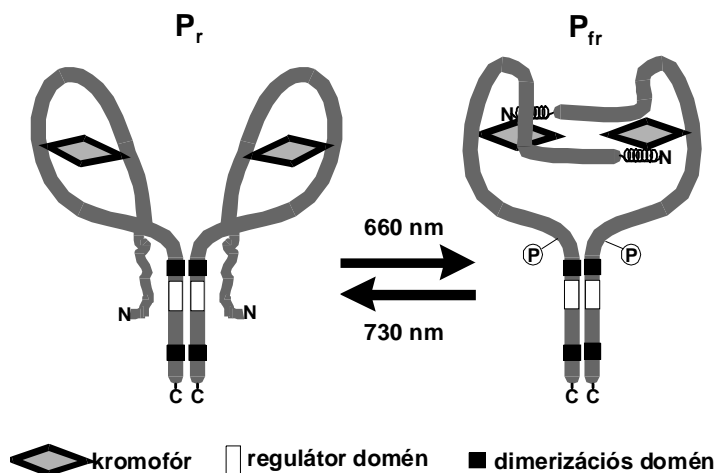


Régóta ismeretes, hogy a fitokrómok két, spektroszkópai és biokémiai szempontból is különböző formában léteznek (2.7. ábra, Schäfer és mtsai, 1972; Song, 1999). Felfedezték, hogy amikor saláta magvakat váltakozó vörös (660 nm) és sötétvörös (730 nm) fényvel világítottak meg, majd sötétbe helyeztek, a csírázás csak azoknál a magvaknál következett be, amelyeknél az utolsó megvilágítás vörös fényvel történt. Ebből a kísérletből arra lehet következtetni, hogy a vörös fény aktivál egy pigmentet (vörös fény receptor), amely azután kiváltja a csírázást, azonban a pigment elveszti aktivitását, amikor sötétvörös fényt abszorbeál. A váltakozó, vörös és sötétvörös besugárzás hatása azt mutatja, hogy a pigment két formája egymásba alakítható. A pigment rendszernek, amelyet fitokróm rendszernek (P) nevezünk, két formája van:

$P_{660}$  vagy  $P_r$  (red light-absorbing phytochrome, vörös fényt abszorbeáló forma)

$P_{730}$  vagy  $P_{fr}$  (far-red light-absorbing phytochrome, sötétvörös fényt abszorbeáló forma)

A fitokróm fotoreceptor vörös fényt abszorbeáló, biológiailag inaktív,  $P_r$  formában szintetizálódik a növényi sejtekben, szintézise maga a fitokróm rendszer által szabályozott. A foton-abszorpciót követően a molekula konformáció-változáson (cisz/transz izomerizáció) megy át és távoli vörös fényt abszorbeáló, biológiailag aktív,  $P_{fr}$  formává alakul, amely távoli vörös besugárzással visszaalakítható az inaktív  $P_r$  formává (2.5. ábra). Ezt a jelenséget nevezzük a fitokrómok fotokonverziójának, amelynek révén ezek a fotoreceptorok egyfajta molekuláris kapcsolóként működnek, amelyeket vörös ill. sötétvörös fényvel lehet be-, ill. kikapcsolni.



2.5. ábra. A fitokrómok fotokonverziója.

A  $P_{fr}$  állapot három módon szüntethető meg: fotokonverzióval alakul vissza  $P_r$  formává, sötét- reverzióval alakul  $P_r$  formává, vagy degradációval (ubiquitin lebomlási út) eliminálódik a rendszerből. Bár a sötét-reverzió pontos folyamata ismeretlen, bebizonyították, hogy a fitokrómok  $P_{fr}$  formájának bizonyos hányada fény hiányában is képes visszaalakulni  $P_r$  formává, amely vörös besugárzással újra  $P_{fr}$  állapotba hozható. A *PHYA*  $P_r$  formájának felezési ideje 100-200 óra, míg a  $P_{fr}$  formáé csak 1-2 óra.

A fotokonverzió egyensúlyi folyamat, amelynek állapota egy adott fitokrómra vonatkoztatva a  $P_{fr}/P_r$  formák mennyiségének arányával jellemezhető, és függ a besugárzó fény hullámhosszától és intenzitásától. Természetes körülmények között a különböző fitokrómok egymástól eltérő  $P_{fr}/P_r$  arányt alakítanak ki, amely jellemző az adott fényviszonyokra.

A fitokróm rendszer úgy működik, hogy egy adott körülmény, pl. az árnyék a különböző típusú fitokrómokat eltérő arányban alakítja  $P_{fr}$  állapotba, ami végül az árnyék-elkerülési reakciókban nyilvánul meg. Ha a növény közvetlen napfényre kerül, a  $P_{fr}/P_r$  arány megváltozik az egyes receptor-típusok esetében, ez pedig módosítja a génműködést, ami úgy szervezi át a növény anyagcseréjét és növekedését, hogy az a lehető legjobb hatásokkal tudja felhasználni a fényt.

Az egyes fitokróm gének által kódolt fehérjék változó mértékű hasonlóságot mutatnak egymással aminosav-szekvencia szinten. Így előfordulhat, hogy egy adott faj különböző típusú proteinei kevésbé hasonlítanak egymásra, mint különböző fajok adott típusú fehérjéi. A különböző fitokrómok molekuláris biológiai, genetikai háttere a 90-es években vált világossá. A fitokrómot egy multigén család kódolja a magasabbrendű növényekben. Az *Arabidopsis* nukleáris genom öt fitokróm gént tartalmaz. Ezeket a géneket *PHYA*, *B*, *C*, *D* és *E* jelöléssel különböztetjük meg (Sharrock és Quail, 1989).

A *PHY* gének genomikus DNS-ének szekvencia vizsgálata érdekes filogenetikai következtetéseket tett lehetővé. A kódolt aminosav-szekvencia zárvatermők esetében három alapvető fitokróm protein meglétére utal, a *phyA*, *B* és *C* esetében egyaránt divergens, mintegy 50% homológiával. A gének valószínűleg génduplikációval keletkeztek. Először a (*PHYA* + *PHYC*) és *PHYB* alcsoportok, majd a *PHYA* és *PHYC* alcsoportok divergáltak, ez utóbbiak a virágos növények kialakulása körül. *Arabidopsis*-ban a *PHYE* a *PHYB* vonalból ágazott le valószínűleg a kétszikűek megjelenésekor, majd a *PHYD* megjelenése a *Cruciferae* család kialakulásának kezdetére tehető.

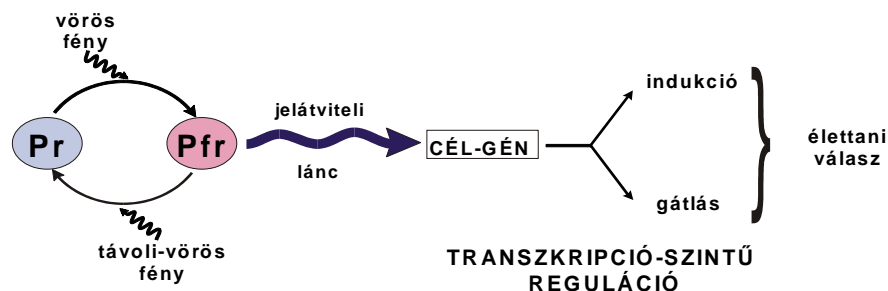
A receptorcsalád két legismertebb és legfontosabb tagja a PHYA és PHYB receptor. A klasszikus fitokróm-válasz néhány jellegzetessége a PHYA kivételével valamennyi fitokróm receptor működésére igazak: a vörös ill. távoli vörös fény ellentétes hatású egy adott folyamatra; váltakozó vörös/távoli vörös kezelés esetén az utolsó besugárzás hatása érvényesül. A fenti megállapítások a PHYA kivételével valamennyi fitokróm receptor működésére igazak. A PHYA receptor által szabályozott folyamatok már nagyon kis mennyiségű  $P_{fr}$  megjelenésére megindulnak, így ezeket nagyon kis intenzitású, ún. VLF (very low fluence) fénnel is ki lehet váltani, valamint az indukciót nem lehet távoli vörös besugárzással gátolni. A PHYA receptor elsősorban etiolált állapotban termelődik magas szinten, különösen a csíranövények gyökércsúcsának és hipokotiljának sejtjeiben. Szerepet játszik a csírázási folyamat megindításában és a „zöldülésben” (etioláció), és fontos a virágzási idő kialakításában is. Fotolabilis molekula, a fitokróm receptorok közül a PHYA lebomlási sebessége a legnagyobb fényben (Clough és Viestra, 1997). A PHYB receptorok által közvetített válaszok kiváltásához kis intenzitású vörös fény szükséges, és az induktív hatás távoli vörös fénnel gátolható. Ezek az ún. LFR (low fluence response) fényválaszok. A PHYB receptor az *Arabidopsis* növények szinte valamennyi szövetében megtalálható. Szabályozza a szár megnyúlását, az árnyék elkerülését, és a virágzást. Mennyisége de-etiolált (zöld) állapotban magasabb. Fénystabil molekula, lebomlási sebessége 50-szer kisebb, mint a PHYA receptoré (Furuya és Schafer, 1996; Whitelam és Devlin, 1997). Korábbi vizsgálatok alapján megfigyelték, hogy a fitokróm rendszer legalább két, fiziológiai funkcióját tekintve különböző készletből áll. Az etiolált szövetben található fitokrómot I. típusú (labilis), míg a zöld szövet fitokrómját II. típusú (stabil) fitokrómnak nevezzük. Mennyiségileg és szabályozó funkcióját tekintve a két készlet jól megkülönböztethető. Az I. típus a fotolabilis fitokrómtól függő reakciókat szabályozza, pl. a *CAB* (fénygyűjtő klorofill a/b protein génje), a *RBCS* (ribulóz -1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz kis alegységét kódoló gén), és a *FED-1* (ferredoxin-1) gének fényindukálta expresszióját, valamint a pigmentképzést. A II. típus a fotostabil fitokrómtól függő reakciókat szabályozza, ilyenek a fényen nőtt növények reakciói.

A különböző fitokróмок specifikus reakcióinak tesztelésére nincs *in vitro* módszerünk, ezért a funkcióikat csak *in vivo* tanulmányozhatjuk. Ez azonban bonyolult feladat, hiszen a fent említett fitokróмок többsége egyidejűleg is expresszáva lehet a növényben, és a hatások több gén termékétől is származhatnak. Ezért olyan kísérleti rendszerre van szükség, amelyben egyidőben egy detektálható fitokróm működik. Ilyen rendszer a nyugalmi állapotú *Arabidopsis* mag csírázásának fotoindukciója. Közvetlenül a mag

duzzadása (imbibíció) után egyedül a phyB az alapvető fitokróm, amely a mag csírázásának fotoreverzibilis indukcióját szabályozza. Amennyiben a phyB jelen van, sem a phyA, phyC, D vagy E nem képes a csírázás indukálására. A phyA által indukált csírázás nagyon alacsony intenzitású, de széles spektrumtartományú fényben történik (300-770 nm), azonban fotoreverzibilitást nem lehetett megfigyelni. Ez a phyA-specifikus indukció a növényvilág egyik legfényérzékenyebb reakciója, és így a phyA-t tekinthetjük a VLFR fotoreceptorának. Ezzel ellentétben a phyB fotoreverzibilis módon indukálja a csírázást 550-690 nm-es vörös megvilágítás hatására, de ez az indukció fotoreverzibilisen megakadályozható hasonló intenzitású, 700-800 nm hullámhosszú távoli vörös fény alkalmazásával. Fontos, hogy a csírázás akkor induljon meg, amikor a mag olyan távolságra van a talaj felszínétől, hogy a csíranövényeknek esélyük van elérni a felszínt, mielőtt még tartaléktápanyagai kimerülnének. Ehhez pedig nagyon alacsony intenzitású fényt kell érzékelnie (PHYA, VLFR). Viszont, miután a növény kiemelkedett a földből, teljesen más fényviszonyok közé kerül, magasabb intenzitás-tartományban kell érzékelnie a fényváltozásokat, pl. különbséget kell tennie árnyék és közvetlen napfény között (PHYB, LFR).

A fitokróm rendszerrel foglalkozó kutatások már évtizedek óta keresik a választ azokra a kérdésekre, hogyan működik a receptor-molekula, hogyan történik a fitokrómok jelátadása; mi a fotoreceptortól kiinduló jel sorsa, milyen jelátviteli utakon továbbítódik, milyen elemekből épülnek fel ezek az utak. Ezek a rendszerek a legkülönbözőbb környezeti változásokra adott válaszreakciókat közvetítik, és alapvetően egy kináz szenzorból és egy válaszregulátorból állnak. A környezeti változó autofoszforilációra készíti a kinázt, majd a foszforilált hisztidin a foszfátcsoportot átadja a válaszregulátor egy aszparaginsavjának, amely a jelet továbbadja a következő jelátviteli komponensnek.

A **2.6. ábrán** vázolt hipotézis volt az első elképzelés a fitokróm rendszer működéséről. Ekkor még csak a fotoreceptorok szerepe volt tisztázott, a rendszer két végpontját – a bemenetet és a kimenetet - összekötő reakcióút részletei még ismeretlenek voltak.



2.6. ábra. A fitokróm-függő jelátvitel kezdeti modellje

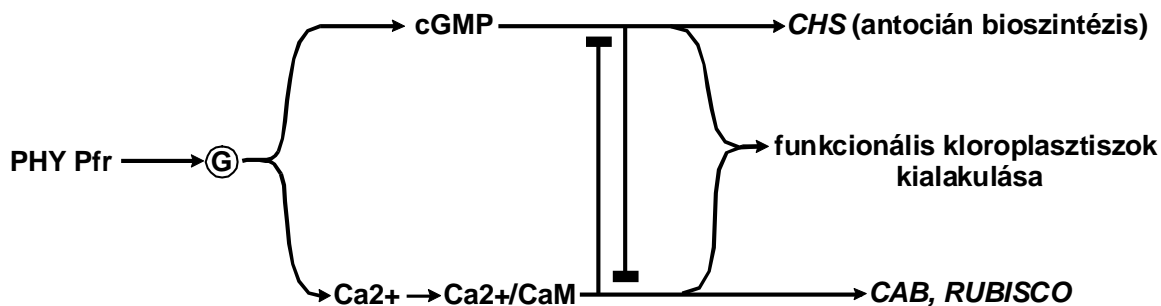
Általánosan elfogadott feltételezés volt, hogy a jelátviteli utak felépítése és működése meglehetősen konzervált a különböző organizmusok között. Ezért megpróbálták igazolni más szervezetekben már leírt jelátviteli utak komponenseinek meglétét a növényi sejtekben, valamint e komponensek szerepét. A 90-es évek elején a különböző szervezetek szignál-proteinjein végzett számítógépes szekvencia-elemzések segítségével kiderült, hogy a fitokrómok C-terminális részének regulátor doménje figyelemreméltó hasonlóságot mutat a bakteriális két-komponensű jelátviteli rendszerek közvetítő (transzmitter) egységének hisztidin kináz moduljával (Schneider-Poetsch és mtsai, 1991). Később kimutatták, hogy a zab PHYA receptor *in vivo* és *in vitro* autofoszforilálódik, valamint *in vitro* képes foszforilálni más szubsztrátokat is, mint pl. a hiszton H1 fehérjét vagy mesterséges polipeptideket. Az autofoszforiláció szerin aminosavat foszforilál, szemben a kékalga fitokróm működésével (hisztidin/aszpartát). További különbség a két molekula között, hogy az autofoszforiláció a zab esetében a  $P_{fr}$  formában nagyobb fokú, míg a kékalga fitokróm esetében a  $P_r$  formában. Az egyéb szubsztrátok transz-foszforilációja nem mutatott fényfüggést (Yeh és Lagarias, 1998). Annak kiderítéséhez, hogy a fitokrómok  $P_r$  vagy  $P_{fr}$  formája rendelkezik nagyobb kináz aktivitással, szükségesnek tűnt a fitokrómok valós szubsztrátjának azonosítása. Ez a megközelítési mód hasznos információkat nyújt a jelátviteli rendszer felderítése, és a fitokróm utáni/alatti elemek megismerése szempontjából is.

Biokémiai és molekuláris vizsgálatok azt bizonyították, hogy a fitokrómok jelátvitelére több, különböző mechanizmust magába foglaló úton megy végbe. Ezek a  $Ca^{2+}$ , a G-protein által szabályozott, valamint foszforilációs lépéseket tartalmazó jelátviteli kaszkádok.

A  $\text{Ca}^{2+}$  által szabályozott reakciók mind a növényi, mind az állati sejtben általában  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő fehérje jelenlétét igénylik. A  $\text{Ca}^{2+}$ -nak és a kötőfehérjének ez a komplexe indítja el a reakciót. A legáltalánosabban előforduló és legjobban ismert a kalmodulin, bár több ilyen fehérje ismert mind a növényi, mind az állati sejtben. A kalmodulinnak magas a  $\text{Ca}^{2+}$ -kötő affinitása. A kötődés hatására megváltozik a fehérje konformációja, aktív formába kerül és sok szabályozó enzimet serkent a sejtben. Számos kalmodulin-szabályozott enzimet találtak a növényi és állati sejtekben egyaránt. Ilyenek a plazmamembránban található  $\text{Ca}^{2+}$ -pumpák ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-ázok), NAD-kinázok, és egyéb kinázok és foszfatázok. A kalmodulin jelen van mind a citoszolban, mind az organellekben, beleértve a plasztiszomákat, a mitokondriumokat és a sejtmagot. A kalmodulin, a sejtben belüli környezetben bekövetkező kis  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változására is képes aktiválódni. Ez a sajátossága alkalmassá teszi arra, hogy néhány fitokróm molekula fotokonverzióját felerősítse nagyobb celluláris változássá, és arra hogy szabályozzon más regulátor rendszereket. A következő megfigyelések utalnak arra, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  szerepet játszik a fitokróm reakciók közvetítésében: a  $P_{730}$   $\text{Ca}^{2+}$  emelkedést indukál egy vagy több szubcelluláris kompartmentumban; a kalmodulin serkent néhány  $P_{730}$  által stimulált enzimet; néhány vörös fény által indukált reakció kalmodulin inhibitorokkal gátolható. Vizsgálták azt a kérdést is, hogy a kalmodulin képes-e érzékelni, fizikai reakcióvá alakítani a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot, mint jelet. Megnézték, hogy a fenotiazinok és a kalmidozolium, mint kalmodulin antagonisták, a kalmodulinhoz kapcsolódva megakadályozzák-e a célenzim aktiválását, képesek-e blokkolni a  $\text{Ca}^{2+}$  által indukált fitokróm reakciókat. Mind a páfrányspóra csírázása, mind a kloroplaszt rotációja ezekkel blokkolható volt, így a feltételezés megerősítést nyert. A fitokróm fotoaktivációjával kapcsolatos reakciók egyike az internódium megnyúlás mértékének vörös fény okozta gátlása. Az egyik fő enzim a plazmamembránban elhelyezkedő  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áz, amely kalmodulin szabályozás alatt áll. Kimutatták, hogy zab sejtekben a  $P_{730}$  stimulálja a  $\text{Ca}^{2+}$ -effluxot. A növekvő  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció pedig gátolja azokat a biokémiai folyamatokat, amelyek a sejt megnyúlásához vezetnek. Összefoglalva elmondható, hogy a citoszolban  $P_{730}$  által indukált  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció emelkedés előidézi a kalmodulin aktiválódását, ezáltal a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáz működését, aminek következtében megnő a sejt fal  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációja és csökken a sejtmegnyúlás mértéke.

A phyA-függő folyamatokat G-protein inhibitorokkal lehet gátolni, míg intermedierekkel, például cGMP-vel stimulálni lehetett. A G-proteintől induló jelátviteli út ez esetben kétféle ágazik: a kloroplasztisz fejlődéshez szükséges gének többségének expressziója  $\text{Ca}^{2+}$ -függő,

míg az antocianin bioszintézis teljes mértékben cGMP-függő. A G-proteinek feltételezett szerepe a fényindukált génkifejeződésben a **2.7. ábrán** látható.



**2.7. ábra. A "G protein hipotézis"**

A receptorról a jel egy membránköthött G-proteinre tevődik át, ezután az út két irányba ágazik el. Az egyik ág a ciklikus GMP szint szabályozásán keresztül többek között a kalkon-szintáz (CHS) gén kifejeződését serkenti. A másik a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin szint változtatásával a kloroplasztiszok felépítésében fontos fehérjék szintézisét irányítja (CAB, RBCS). Ugyanakkor mindkét út együttes aktivációja funkcionális kloroplasztiszok kialakulásához vezet (Bowler és mtsai, 1994a). Továbbá, a két jelátviteli út között negatív reciprok szabályozás érvényesül (Bowler és mtsai, 1994b). Ha például a cGMP ág hiperaktív, csökkenti a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin ág aktivitását, azaz a nagyon magas szintű kalkon-szintáz szintézis alacsonyabb szintű CAB kifejeződést eredményez. Problémát jelentett a kísérletek értelmezése során, hogy a megfelelő vegyületek injektálása után a válaszreakció csak 48 óra múltával jelent meg. Ezzel szemben a fitokróm-indukált génexpresszió néhány órán belül detektálható. Valószínűleg ez is szerepet játszott abban, hogy a fitokróm-mediált jelátvitel kutatására a tudósok egyéb megközelítéseket választottak.

A phyA és phyB molekulák C-terminálisának PAS-domént (prolin-alanin-szerin) tartalmazó régiói egymással kicserélhetők, részt vesznek a jel átadásában. A phyB C-terminális ezen doménje segítségével sikerült azonosítani egy bázikus helix-hurok-helix fehérjét, a PIF3 (phytochrome-interacting-factor) proteint. Bebizonyították, hogy a PIF3 részt vesz a jelátvitelben, és a sejtmagban konstitutív módon lokalizálódik. Ily módon a jelátadáshoz a phyA és phyB molekuláknak kell a sejtmagba vándorolniuk. A sejtmagban történik meg a PIF3-mal való kölcsönhatás, mint a jelátvitel korai eseménye. A PIF3 azonban nem az egyetlen faktor, amellyel a fitokrómok kölcsönhatnak.

Egy nukleozid difoszfát kináz 2 (NDPK2) tisztított phyA<sub>fr</sub> formával lép kölcsönhatásba. Kísérleti adatok arra utalnak, hogy az NDPK2 a phyB jelátvitelének pozitív komponense. A fitokrómok sejtmag és citoplazma közti közlekedésének hátterében a bonyolult molekuláris mechanizmusok állnak. A fehérjék transzportja a citoplazmából a sejtmagba kizárólagosan az ún. nukleáris pórus komplexeken (NPC) keresztül történik, úgy hogy ezek a nyílások átjárhatóságot biztosítanak a molekuláknak a két kompartmentum között (Stoffler és mtsai, 1999; Merkle, 2003; Lim és Fahrenkrog, 2006; Tran és Went, 2006). A 40 kDa-nál kisebb molekulák át tudnak diffundálni ezeken a pórusokon minden nehézség nélkül, passzívan. Transzport mechanizmusnak, a maghártya túloldalára átjutó nagyobb fehérjék vagy azok komplexei által könnyített transzlokációt nevezzük; amely ellentétben a diffúzióval, a koncentráció gradiens ellen működik (Ribbeck és Gorlich, 2001).

A fitokrómok, ezek a nagyméretű dimer fehérjék aktívan jutnak be a sejtmagba, ami energiaigénylő folyamat. A nukleáris transzlokáció a célprotein felismerésével kezdődik a transzport receptor (pl. importin  $\beta$ -szerű receptor) segítségével, ezt követi a szubsztrát maghártyához való kapcsolódása, majd annak átjutása a membránon. Az importinoknak két alosztálya van, az  $\alpha$ -szerű és a  $\beta$ -szerű importin fehérjék (Merkle, 2003). A  $\beta$ -szerű importin receptorok a sejtmagi szállítás komponensei, rögzítik a szállítandó fehérjét az NPC-hez, közvetlenül a nukleoporinokhoz és a célproteinekhez kötődve. Az importin  $\beta$ -szerű receptorok megkönnyítik a nagyméretű fehérjéknek vagy azok komplexeinek a sejtmag pórusain való átjutását. A sejtmagon belüli  $\beta$  importin kölcsönhat a GTP-kötő RanGTP-ázzal és elengedi a célproteint. A  $\beta$  importin receptor-RanGTP komplex visszajut a citoplazmába, ahol a GTP a Ran által hidrolizálódik és a komplex disszociál, szétválik. Az import fehérjék hordozzák a klasszikus nukleáris lokalizációs szignált (NLS), amely az  $\alpha$  típusú importinok működéséhez szükségesek, melyek úgy viselkednek mint a citoplazmás NLS receptorok (Gorlich és mtsai, 1995). A  $\beta$  importin receptorokkal ellentétben, az  $\alpha$  típusú importinok nem tudják elhagyni a sejtmagot saját maguk. Ennek következtében az  $\alpha$  importinok visszajutása a citoplazmába egy transzport receptor segítségével történik, amelyik speciálisan az  $\alpha$  importinokat szállítja a sejtmagból (Kutay és mtsai, 1997).

Az importinok vélhetőleg részt tudnak venni a fotoreceptorok sejtmagba vagy sejtmagból történő irányításában, ha a fitokrómok tartalmazzák az NLS szignálokat. Sakamoto és Nagatani (1996) vizsgálta a 35S:phyB::GUS fúziós protein sejtmagi elhelyezkedését. Először mutatták ki, hogy a phyB C-terminális része vándorol a sejtmagba, ami arra utalt, hogy a molekulának ebben a részében egy aktív NLS található. Egyéb tanulmányok



rámutattak, hogy a PHYB karboxil végződése kerül át a sejtmagba és a sejtmagi testekbe (NB), de a *phyB* hiánymutánsokat még nem sikerült komplementálni (Matsushita és mtsai, 2003). Beszámoltak arról is, hogy a PHYB C-terminális része és a NB formációk sejtmagi szállítása a fényviszonyoktól függetlenül történik (Nagy és mtsai, 2000, 2001; Nagy és Schafer, 2002). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a „szállító gépezet” képes felismerni és a sejtmagba irányítani a PHYB C-terminális részét, de a fényfüggő nukleáris transzport a PHYB N-terminális régiójának jelenlétét is megköveteli. Másrészt megmutatták, hogy a PHYB N-terminális fele nem jut át a sejtmagba, nem alakulnak ki sejtmagi testek, és nem állítja helyre a *phyB* hiánymutánsokat. Megállapították, hogy a sejtmagi „szállító gépezet” képtelen felismerni a csonkolt PHYB fehérjét.

A *phyB* fehérjének melyik régiója felelős a fény-indukált jelátvitel elindításáért? Hogy erre a kérdésre megtalálják a választ, Matsushita és mtsai. (2003) létrehozta egy fúziós fehérjét, amelyben funkcionális NLS (sejtmagi lokalizációs jel) vagy NES (sejtmagi kiviteli jel) jeleket és GUS riporter gént kapcsolnak a PHYB N-terminális feléhez, majd ezt a fúziós fehérjét *phyB-5* mutáns háttérben fejezték ki. Eredményeik meggyőzően mutatták, hogy a PHYB N-terminális része elegendő a PHYB által történő fény jelátvitelben, de csak amikor az a sejtmagban helyezkedik el; és a C-terminális rész felelős a dimerizációért, a sejtmagi vándorlásért, a stabil PHYB sejtmagi testek kialakulásáért. Érdekes módon, a C-terminális részen található egy hiánymutáció is, megakadályozva a teljes hosszúságú PHYB hatékony transzlokációját a sejtmagba.

Az azonban még nem világos, hogy a *phyA* jelátviteli útja hogyan kapcsolódik a sejtmagi negatív választ adó elemek komplex rendszereihez; *COP* (constitutive photomorphogenesis), *DET* (de-etiolated), és a *FUS* (fusca) gének (Deng és mtsai, 1992) termékeihez. E gének a fotomorfogenezis negatív elemeiként működnek, azaz sötétben felfüggesztik a fotomorfogenezist, és a skotomorfogenezis útjára terelik a folyamatot. Ez a folyamat megfordítható fény hatására, és jól nyomonkövethető molekuláris szinten is a fényindukált gének aktivitásának csökkenésében ill. növekedésében. A *COP/DET/FUS* csoportba tartozó gének által kódolt fehérjék konstitutív módon a sejtmagban találhatók, a COP1 fehérje kivételével, amely sejten belüli elhelyezkedése fényfüggő módon változik: sötétben a sejtmagban, fényben a citoplazmában található (Osterlund és mtsai, 2000). Kimutatták, hogy sötétben a COP1 fehérje kölcsönhatásba lép a HY5 transzkripció faktorral, amelyet poliubiquitin polipeptidek kapcsolásával tesz felismerhetővé a proteolízis számára. A HY5 a GBF családba tartozik, de konstitutívan a sejtmagban található transzkripció faktor. Állandó fényben nevelt *hy5* mutáns növények hosszú

hipokotillal rendelkeznek, hullámhossztól függetlenül. Ebből arra következtethetünk, hogy a HY5 a különböző fotoreceptoroktól kiinduló jelátviteli láncok találkozási pontja után foglal helyet a fotomorfogenezis kiváltásához vezető fényfüggő jelátviteli útban. Ugyanakkor a fényben nevelt *hy5* növények külső jegyei nem egyértelműen etiolált fenotípusúak, ami egyéb, a HY5-hoz hasonló működésű transzkripciós faktorok létét feltételezi. A COP1 sötétben elősegíti a HY5 transzkripciós faktor lebomlását a sejtmagban, ami a fényindukált gének működésének gátlásához vezet. Fényben pedig a COP1 fehérje a citoplazmába vándorol, ami az általuk szabályozott gének aktivációját eredményezi (Hardtke és mtsai, 2000). Az eddigiekből nyilvánvaló, hogy a COP1 fehérje meghatározó szerepet játszik a sejtmagban zajló fényregulált proteolízis folyamatának szabályozásában, valamint a különböző fotoreceptoroktól kiinduló jelátviteli utak szabályozási láncának végén, annak utolsó tagjai között helyezhető el.

A fitokróm segíti a növényeket a változó fényviszonyokhoz való alkalmazkodásban. Mint tudjuk, a növény habitusát alapvetően befolyásolják azok a fényviszonyok, amelyek között él. Ezért a mesterséges fénnel való megvilágításnál körültekintően kell eljárni, mind az üvegházak, mind a klímakamrák megvilágításánál, ahol a természetes fényt részben vagy egészben helyettesíteni kell.

A fitokróm a növény más növény általi árnyékolása mértékének indikátoraként szolgálhat. Az árnyékolási jelenség abból adódik, hogy a zöld levelek abszorbeálják a vörös fényt a magas klorofilltartalmuk miatt, de viszonylag áteresztőek a hosszabb hullámhosszú sötétvörös fény számára. Amint az árnyékolás növekszik, a vörös/sötétvörös csökken és a P730 aránya az össz-fitokrómban csökken. Kísérleti körülmények között minél magasabb a sötétvörös tartalom, annál nagyobb a szár megnyúlásának mértéke a teljes napfényben nőtt növényekhez viszonyítva. Az árnyékoló növények normálisan növekednek az árnyékos körülmények között és nagyon kicsi vagy nincs is változás a szár megnyúlásának mértékében, ha magasabb vörös/sötétvörös értékű sugárzást kapnak. A kedvező internódium megnyúlásának ára a csökkent levélfelület és a kevesebb elágazás, de rövidtávon ez az evolúciós adaptáció jól működik.

A fitokróm segítségével a növény a szomszéd egyed jelenlétét olyan távolságból is érzékeli, amely távolságból a fotoszintetikusan aktív fény intenzitásában még nem történik változás. A megnövekedett horizontális vörös fény intenzitás hatására az egyed fokozott megnyúlásos növekedéssel és negatív fototrópos reakcióval válaszol, azaz elhajlik a szomszédától. A szomszéd növény és az egyedsűrűség érzékelésében a fitokrómon kívül a kriptokróm is részt vesz.

### 2.2.2. Kriptokrómok

A kriptokrómok a kék fény receptorainak gyűjtőneve (Gressel, 1977). A kék fény szabályozza a növény növekedésének és fejlődésének számos folyamatát. Az etiolált növény zöldülése (de-etioláció), a hipokotil megnyúlásos növekedésének gátlása, a sziklevelek kiterülése, a növények fény irányába történő elhajlása, növekedése (fototropizmus) és a sztóma nyitódása mind kék fényre kialakuló válaszreakciók.

A kriptokróm receptor abszorpciós spektruma a 400-500 nm-es, valamint a 320-390 nm-es (UV-A) hullámhossztartomány.

A kriptokrómok felfedezéséhez olyan fotomorfogenikus mutáns növények vizsgálata vezetett, amelyekben a mutáció következményeként specifikusan a kék fényre adott válasz képessége sérült (Koornneef és mtsai, 1980; Hoffman és mtsai, 1996). Molekuláris biológiai módszerek segítségével *Arabidopsis thaliana* növényben legalább háromféle kék fény-receptort azonosítottak. Ezek a CRY1 (kriptokróm 1), CRY2 (kriptokróm 2) és a fototropin, amelyek elsősorban a hipokotil-megnyúlás gátlását, a virágzást, ill. a fototropizmust szabályozzák. Ezekről eltérő kékfény-receptor a zeaxantin-violaxantin rendszere, amely a sztóma nyitódásáért felelős.

Fontos megemlíteni a kék fény – vörös fény együttes hatását a cirkadián óra működésében vagy a virágzás időzítésében.

A kriptokróm 1 génjét (*CRY1*) *Arabidopsis*-ban azonosították. A CRY1 géntermék N-terminális szakasza a bakteriális DNS-reparáló DNS-fotoliázhoz hasonló, amely enzim kék és UV-A fényfüggő elektronátadásos mechanizmussal működik. A CRY1 protein elsődlegesen FAD molekulát köt, valamint fotoliáz-homológ doménjeihez pterin kötődik, amely esetleg második kromofórként is szerepelhet. A protein a fotoliáz aktivitását már elvesztette az evolúció folyamán, azonban fényreceptorként működőképes. Az *Arabidopsis* CRY1 szolubilis fehérje a növények valamennyi szervében megtalálható (Ahmad és Cashmore, 1993). Fotostabilis molekula, mivel fénykezelés hatására a CRY1-szint nem változik jelentősen a növényi sejtekben (Lin és mtsai, 1996). A CRY1-nek fontos szerepe van a fotomorfogenezisben; gátolja a sötétben vagy talajban csírázó magvak hipokotiljának növekedését a fényre kerüléskor, és serkenti a sziklevelek kiterülését és a zöldülést. Szerepet játszik a virágzás indukciójában, valamint több, az antocián bioszintézis korai enzimjeit kódoló gén kifejeződésének serkentésében. A *cry1* hiánymutánsok ezeket a reakciókat nem mutatják, tehát a fitokróm rendszer nem helyettesíti.

A kriptokróm 2 génjét (*CRY2*) is *Arabidopsis*-ban azonosították. A *CRY2* géntermékre jellemző, hogy a de-etioláció folyamán gyorsan lecsökken a koncentrációja, bár a mRNS-szint nem változik. A *CRY2* segítségével a növény fotoperiódusra való érzékenysége csökken, ezen kívül befolyásolja a virágzás idejét.

A *CRY1* és *CRY2* csak kis mértékben különböző, redundáns gének. Az *Arabidopsis* *CRY2* a *CRY1*-hez hasonlóan szolubilis fehérje, és általánosan megtalálható a növény különböző szerveiben (Lin és mtsai, 1998). Fontos különbség viszont a két receptor között, hogy a *CRY2* fotolabilis molekula, kék fény hatására gyorsan lebomlik. A *CRY1* és *CRY2* receptorok működésbeli különbségét az általuk abszorbeálható kék fény intenzitásában láthatjuk, míg az általuk szabályozott folyamatok tekintetében sok átfedés tapasztalható. Az alacsony intenzitású fényingerekre a *CRY1* még érzéketlen, azonban a *CRY2* már hatékonyan képes közvetíteni. Magasabb fényerősség esetén viszont a *CRY2* gyorsan lebomlik, így ilyenkor az elsődleges kékfény-receptor szerepét a *CRY1* tölti be (Lin, 2000).

A fototropin, a fototropizmus szabályozásában szerepet játszó receptor. A fototropizmus a növényi szervek fényindukált helyzetváltoztató növekedési válasza, amelynek első lépése a kék fény érzékelése.

A receptor megismeréséhez az *nph1* (non-phototropic hypocotyl 1) elnevezésű *Arabidopsis* mutáns azonosítása (Liscum és Briggs, 1995) ill. a mutációt hordozó gén izolálása és jellemzése (Huala és mtsai, 1997) vezetett. A megfelelő gént és fehérjét pedig az *NPH1* és *NPH1* rövidítésekkel jelölték. Az *NPH1* fehérje egy 120 kDa tömegű membránkötött protein, amely a megvilágítás hatására foszforilálódik. Az apoproteinen három domén található: a C-terminálisnál egy szerin-treonin kináz domén, az N-terminálisnál pedig két ún. LOV (light, oxygen, voltage) domén, amely fény-, oxigén- ill. feszültség-érzékeny domén (Huala és mtsai, 1997). Az *NPH1* protein a LOV motívumok segítségével köti meg a flavin mononukleotid (FMN) molekulát (Christie és mtsai, 1999). A fototropin egy segédproteinrel (*NPH3*) és egy lipid-módosítással kötődik a membránhoz, egyébként szolubilis állapotban marad.

### 2.2.3. UV-B receptorok

Az UV-B (280-320 nm) sugárzás káros hatásait egyre szélesebb körben vizsgálják. Az utóbbi időben különösen nagy figyelmet fordítottak a spektrum e szakaszára, mivel az ebbe a tartományba tartozó sugármennyiség (főként a 297-310 nm-ig) növekedni fog a

sztratoszféra ózonkoncentrációjának csökkenése miatt, az ózonpajzs elvékonyodása miatt. A nagy intenzitású UV-B besugárzás számos makromolekula (DNS, fehérjék) roncsolódását, lipidek peroxidációját, különböző pigmentek oxidációját, hormonok inaktiválódását, membránváltozásokat és a fotoszintetikus apparátus közvetlen károsodását is okozhatja a növényi sejtekben. Kísérletes körülmények között a kiegészítő UV-B sugárzás hatására csökken a biomassza, a pollen csírázási %-a, károsodást szenved a magképzés, deformálódások következnek be az epidermiszen, változik a kutikuláris viasz összetétele, emelkedik a flavonoidok mennyisége. Ugyanakkor, az alacsonyabb intenzitású UV-B fény fotomorfogenikus folyamatok kiváltására képes. Ilyenek például a hipokotil-megnyúlás gátlása, a szikleveél kiterülésének serkentése, valamint a fenilpropanoid/flavonoid védőpigmentek szintéziséért felelős enzimek génjeinek indukciója (Stapleton, 1992; Teramura, 1996). Bizonyítást nyert, hogy az említett folyamatok megjelenéséért egy feltételezett UV-B receptoron és a hozzákapcsolt speciális jelátvivő láncon keresztül érvényesül (Jenkins, 1997).

Az UV-B tartományt az UV-B fotoreceptor abszorbeálja. A specifikus UV-B hatás megjelenése a fitokróm és a kriptokróm fotoreceptor egyidőben történő aktivációjától függ. A vörös és a 312 nm hullámhosszú UV fény szinergista az antocianin szintézisben.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatócsoportunk egyik fő érdeklődési területe a növényi cirkadián óra és fitokróm fotoreceptorok által szabályozott jelátviteli láncok kölcsönhatása lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) modell-növényben. A dolgozatban bemutatásra kerülő kísérletek során arról a folyamatról kívántunk új vagy alaposabb ismereteket nyerni, amelynek révén a vörös fényt elnyelő fitokróm B (PHYB) receptor által közvetített fény-jelek befolyásolják a cirkadián óra működését. Munkánk során az alábbi fontosabb célokat tartottuk szem előtt:

1. A luciferáz riporter-rendszer, ill. mRNS szintek mérésével és a *phyB-9* funkcióvesztéssel mutáns alkalmazásával meghatározzuk, hogy milyen hatással van a PHYB által szabályozott jelátviteli út az óra működésére (kimeneti ritmusok periódushosszának és fázisának mérése), illetve az órát felépítő óragének kifejeződésének ritmikus paramétereire (periódushossz, fázis) monokromatikus vörös vagy fehér fényben. Ezen kísérletek eredményeképp fontos új információkat nyerünk az óra beállításának molekuláris mechanizmusáról.

2. A PHYB, mint fotoreceptor, az óra beállításán kívül fontos szerepet játszik a fotomorfogenezis és a virágzási idő szabályozásában is. A kísérletek során főként azt vizsgáljuk, hogy ezek a különböző funkciók vajon a PHYB molekula különböző részeihez kapcsolódnak-e, vagy az általános jel a PHYB molekula egy kitüntetett doménjén hagyja el a receptort és későbbi lépések során oszlik több ágra. Ennek érdekében csonka PHYB változatokat fejeztetünk ki a *phyB-9* mutáns háttérben és megvizsgáljuk, hogy ezek mennyiben képesek helyreállítani a mutáns cirkadián, fotomorfogenikus és virágzás-idő fenotípusát.

## **4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1. Kísérleti anyagok és organizmusok**

#### **4.1.1. Vegyszerek**

A kísérletek során használt vegyszerek többségét a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be. A luciferint a Biosynth AG cégtől, a restrikciós endonukleázokat és a DNS módosító enzimeket az MBI/Fermentas cégtől vásároltuk.

#### **4.1.2. Tápoldatok és táptalajok, antibiotikumok**

##### Bakteriális táptalajok

LB (Luria-Bertani Medium) (pH=7,0): 1% (w/v) tripton, 0.5% (w/v) élesztő kivonat, 1% (w/v) NaCl

YEB (pH=7,0): 0.5% (w/v) beef extract, 0,1% (w/v) élesztő kivonat, 0,5% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) szacharóz, 2 mM MgCl<sub>2</sub> (sterilre szűrve, autoklávozás után hozzáadva)

A szilárd táptalaj készítésénél autoklávozás előtt 1,5% (w/v) agart tettünk a folyadékba.

##### Növényi táptalajok

MS3 (Murashige-Skoog Medium) (pH=5,6): 4.3 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 3% (w/v) szacharóz, 1% (w/v) agar

AM (*Arabidopsis* Medium) (pH=5,6): 2,16 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma) 1% (w/v) szacharóz, 0,2% (w/v) fitagél (Sigma)

MS0 (pH=5,6): 4,3 g/l MS (Murashige-Skoog sókeverék, Sigma), 1% (w/v) agar

A munkánk során használt, sterilre szűrt antibiotikumokat autoklávozás (120°C, 25 perc) és 60°C -ra történő hűtés után kevertük a tápoldatba, ill. táptalajba.

Az antibiotikumok felsorolását a kísérleti organizmus szerint csoportosítottuk, feltüntetve az alkalmazott végkoncentrációkat.

##### *Escherichia coli*:

Ampicillin (Amp) 100 µg/ml

Streptomycin (Sm) 100 µg/ml

Tetraciklin (Tet) 100 µg/ml

##### *Agrobacterium tumefaciens*:

Karbenicillin (Cb) 100 µg/ml

Rifampicin (Rif) 25 µg/ml

*Arabidopsis thaliana*:

Higromicin (Hyg) 15 µg/ml

Klaforán (Cf) 200 µg/ml (A klaforánt a bakteriális eredetű fertőződés csökkentésére használtuk AM és MS táptalajokban.)

#### **4.1.3. Plazmid konstrukciók**

A szubklónozási lépésekhez a pBluescriptII SK plazmid vektort (Stratagene) használtuk. A plazmid vektor mérete 2964bp és ampicillin rezisztenciát hordoz. Az *Arabidopsis* transzformálására a pPCV (Plant Cloning Vector) bináris plazmidot (Koncz és mtsai, 1994) használtuk, melyet Koncz Csaba csoportja fejlesztett ki (Max-Planck Intézet, Köln).

A *CAB:LUC+*, *CCR2:LUC+*, *CCA1:LUC+*, *LHY:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+* és *PRR9:LUC+* konstrukciókban használt szentjánosbogár luciferáz + (*LUC+*: módosított *LUC* cDNS, az általa kódolt luciferáz enzim erősebb lumineszcenciát hoz létre, mint a *LUC* fehérje) riporter gén cDNS klónját a Promega cégtől vásároltuk.

A *CAB2* promóter szakasz a *cab2* gén transzlációs start kodonja előtt elhelyezkedő 320 bp hosszú genomi szekvenciát tartalmazza. A kísérleteinkben használt promóter szakaszokat genomi DNS templáton végzett PCR technika segítségével szaporítottuk fel, majd izoláltuk.

A *CCR2* ill. *CCA1* promóter a *ccr2* ill. *cca1* gén előtt található legközelebbi kódoló szekvencia transzlációs stop kodonja utáni első nukleotidtól a vizsgált gén transzlációs start kodonja előtti utolsó nukleotidig terjed.

#### **4.1.4. Baktériumok**

A molekuláris klónozás során a rekombináns plazmidok felszaporítására az *Escherichia coli* XL-1 Blue törzsét (Stratagene) használtuk. Az elkészült pPCV alapú génkonstrukciókat az S17-1 *E. coli* törzs (Max-Planck Intézet, Köln) sejtjeibe transzformáltuk, mivel ezek a sejtek képesek konjugációra az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Rif<sup>R</sup>) törzsével (Max-Planck Intézet, Köln). E folyamat során az adott génkonstrukciót tartalmazó bináris vektor az *Agrobacterium* sejtekbe jut át. A használt *Agrobacterium* törzs hordozza a pMP90RK plazmidot (Km<sup>R</sup>), amelyen az eredeti Ti plazmid vir (virulence) génjei találhatóak. E gének által kódolt fehérjék szükségesek



ahhoz, hogy a bináris vektor T-DNS szakaszát (a jobb és bal oldali határszekvenciák közötti rész, amely a génkonstrukciókat is tartalmazza) a növényi sejtekbe juttassa (Koncz és mtsai, 1994).

#### **4.1.5. Növények**

Munkánk során *Arabidopsis thaliana* vad típusú és *phyB-9* mutáns növényeket használtunk Columbia-0 (Col-0) háttérben.

A transzgenikus növény előállítására a Clough és Bent által leírt (1998) *Agrobacterium*mal történő viráginfiltrációs módszert alkalmaztuk. A mutáns növények vizsgálatokor alkalmazott további riportergén konstrukciókat (*CCR2:LUC+*, *CCA1:LUC+*, *LHY:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+* és *PRR9:LUC+*) szintén *Agrobacterium* által közvetített géntranszfer (Clough és Bent, 1998) segítségével juttattuk be a mutáns és a vad típusú növényekbe. A riportergének expresszióját mindegyik háttér esetében (mutáns és vad típus) legalább 3 független transzformáns növényi vonalban vizsgáltuk meg.

#### **4.1.6. Fénykezelések**

A növényeket steril körülmények között, MS táptalajon neveltük, 12 h fény ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )/ 12 h sötét fotoperiódus mellett, 22°C-on (MLR-350, Sanyo, Gallenkamp, UK) 7 napig. Majd ZT 12-nél folyamatos sötétbe vagy ZT 0-nál folyamatos fénybe helyeztük azokat, állandó 22°C-os hőmérséklet mellett. A ZT 0 jelenti az állandó körülmények közé helyezés előtti utolsó sötét-fény átmenet időpontját. A fénykezelésk során hideg-fehér fluoreszcens fénycsöveket vagy vörös LED lámpákat (Quantum Devices Inc, USA) használtunk monokromatikus fényforrásként. Az emittált fény hullámhossza, ill. a kezelések során alkalmazott fényintenzitás a következő volt: vörös (667 nm  $\approx 40 \mu\text{mol foton/m}^2/\text{s}$ ).

### **4.2. Molekuláris biológiai módszerek**

#### **4.2.1. Plazmid DNS tisztítás (Sambrook és mtsai, 1989)**

A megfelelő plazmidot hordozó baktériumsejteket szelektív antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban növesztettük 37°C-on 12 órán keresztül állandó rázatással. A sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze, majd lizozimes emésztés után alkalikus SDS kezeléssel

tártuk fel. A fehérjét 3 M KOAc oldattal csaptuk ki. Ezután fenolos tisztítást végeztünk, majd a plazmid DNS-t alkohollal csaptuk ki. 70%-os alkohollal való mosás és szárítás után a csapadékot TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0) oldottuk fel. Így restrikciós emésztésre alkalmas plazmid DNS-t nyertünk.

#### **4.2.2. Növényi genomiális DNS tisztítás**

A fiatal növényi levélmintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd rázógép (Retsch, MM 301) segítségével homogenizáltuk. Ezután a mintákat CTAB pufferrel (1% cetil-trimetil-ammóniumbromid, 100 mM Tris-HCl pH=8,0, 20 mM EDTA pH=8,0, 1,4 M NaCl, 1% polivinil-pirrolidin) és  $\beta$ -merkaptóetanollal tártuk fel, majd 65°C-on inkubáltuk. A sejt- és szövettörmelék centrifugálással történő kiülepítése után, a felülúszót azonos térfogatú kloroformmal kicsaptuk. A kapott vizes fázishoz 2/3 térfogatnyi izopropanolt adtunk, majd szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kicsapott nukleinsavakat centrifugálással gyűjtöttük össze, majd a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákuum alatt szárítottuk, végül 100  $\mu$ l milliQ vízben oldottuk fel. Ezután RN-áz kezelést alkalmaztunk. A kicsapódott DNS-t centrifugálással gyűjtöttük össze, 70%-os alkohollal mostuk, vákuum alatt szárítottuk, végül 100  $\mu$ l milliQ vízben oldottuk fel. A kapott genomi DNS minőségét és mennyiségét agaróz gél-elektroforézissel ellenőriztük. A mintából 1-2  $\mu$ l-t használtunk templátként a PCR reakciók során.

#### **4.2.3. DNS hasítása restrikciós endonukleázokkal, ligálás, baktérium-transzformáció**

A restrikciós endonukleáz emésztések során 1-2  $\mu$ g DNS-t hasítottunk 0,5 egység enzimmel a gyártó által javasolt pufferben és hőmérsékleten 1-2 óráig. A hasítási termékeket etidiumbromid tartalmú, 1-1,5%-os (w/v) agaróz gélen választottuk el elektroforézissel.

A szubklónozás során kivágtuk a megfelelő fragmentumokat az agaróz gélből (Sambrook és mtsai, 1989), majd fenolos extrakcióval kitisztítottuk és abszolút etanollal kicsaptuk. Mosás és szárítás után steril desztillált vízben oldottuk fel azokat. A fragmentumok relatív mennyiségét agaróz gélen ellenőriztük.

A ligálás reakcióelegyét a restrikciós enzimekkel linearizált vektor, a beépítendő fragmentum, a gyártó által javasolt puffer és a T4 ligáz enzim alkotta. A reakcióelegyet 17°C-on min. 2 órán át inkubáltuk, majd a ligátumot  $\text{CaCl}_2$ -oldatos mosással kompetenssé

tett XL-1 Blue sejtekbe transzformáltuk (Sambrook és mtsai, 1989). A sejteket az adott vektornak megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB táptalajra szélesztettük, majd 37°C-on növesztettük.

Amennyiben a plazmid vektor lehetőséget nyújtott a rekombináns kolóniák kék/fehér színszelekcióval ( $\alpha$ -komplementáció) történő kiválasztására, a táptalajt IPTG és X-GAL (25-25  $\mu\text{g/ml}$ ) vegyületekkel is kiegészítettük.

#### **4.2.4. *Agrobacterium* konjugáció**

Az elkészült bináris plazmid vektort *E. coli* S17-1 törzsbe transzformáltuk, majd 2 ml, ampicillinnel kiegészített LB folyadékkultúrában 16 órán keresztül növesztettük. Az *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 törzséből YEB tápoldatban 24 óra alatt friss tenyészetet állítottunk elő. A két baktériumszuszpenzióból 1-1 ml-t összekevertünk és YEB táplemezen együtt növesztettük. 24 óra után a baktériumtenyészetből kis mennyiséget rifampicin és karbenicillin tartalmú YEB lemezre szélesztettük, majd a felnövekvő rezisztens *Agrobacterium*-telepeket legalább 3 alkalommal passzáltuk.

#### **4.2.5. Össz-RNS izolálás RNA Later-ben tartósított növényi mintákból a Qiagen RNeasy Plant Mini Kit használatával**

A tartósított *Arabidopsis* növényi mintákról leitatott az RNA Later-t. A leitatott mintákat RLT pufferrel kezeltük, majd MixerMill rázógép segítségével feltártuk a sejteket. Ezután a mintákat 56°C-on inkubáltuk, majd a lizátumokat a lila oszlopokra pipettáztuk és centrifugáltuk. Az átszűrt lizátumok EtOH-t tartalmazó csövekbe pipettáztuk, majd ezt a keveréket átvittük a pink oszlopokra. Ezután centrifugálás következett, majd kiöntöttük az átfolyókat a gyűjtőcsövekből és az oszlopokra ráértünk az RW1 puffert. Ezután centrifugáltuk a mintákat, majd az átfolyókat kiöntöttük. A következő lépésnél DNaseI mixet (RDD puffer és DNase stock\*) mértünk az oszlopokra. 15 perc múlva pedig megismételtük az RW1 pufferrel végzett kezelést. Ezután az oszlopokra RPE puffert mértünk, centrifugáltuk azokat, majd kiöntöttük az átfolyót. Ezt a lépést még egyszer megismételtük. Ezután áttettük az oszlopokat a Qiagen csövekbe és RNase-free (RN-áz mentes) vízzel eluáltuk a mintákat.

#### **4.2.6. cDNS szintézis RT-PCR-hoz (Fermentas Kit #K1622)**

Az RNS mintához először hozzáadtuk a random hexamer primert, és 70°C-on inkubáltuk. Majd a mintához hozzáadtunk: 5×reakció puffert, RN-áz inhibitor és 10mM dNTP-t, és 25°C-os inkubálás következett. Ezután reverz transzkriptázt adtunk hozzá, és 42°C-on inkubáltuk a mintát. Végül még egy 70°C-os inkubálás következett. A kapott cDNS mintát jégen tartottuk az RT-PCR-hoz történő felhasználásig, azután lefagyasztva tároltuk a maradékot.

#### **4.2.7. Western-blot analízis**

1 g növényi anyagot (csíranövényeket vagy fiatal leveleket) folyékony nitrogénben lefagyasztottunk és dörzsmozsárban homogenizáltunk. Az elporított mintára 1 ml extrakciós puffert mértünk [100 mM MOPS pH: 7.6, 50 % (v/v) etilén-glikol, 5 mM EDTA, 14 mM β-merkaptó-etanol, 10 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml PMSF]. Miután a megfagyott puffer felolvadt, további 2 percig folytattuk a homogenizálást. A törmelékot centrifugálással ülepítettük (Sorwall SS34 rotor, 10000 rpm, 20 perc, 4 °C). 200 µl felülúszót 1 ml 6x Laemmli SDS puffert [300 mM Tris-HCL pH: 6.8, 60 % (v/v) glicerín, 12 % (w/v) SDS, 0.6 % (w/v) brómfenol-kék, 200 mM DTT] tartalmazó csövekbe mértünk, keverés után 100 °C-on inkubáltuk 3 percig. Ezen a módon elkészített preparátumok - 20 °C-on tárolva 2-3 hónapig alkalmasak voltak a további vizsgálatokra. A felülúszó megmaradt részéből Bradford módszerével (Bradford, 1976) meghatároztuk a preparátumok össz-fehérje tartalmát.

Mintánként 10 µg össz-fehérjét szeparáltunk 8 %-os poliakrilamid-SDS gélen. Az elválasztott fehérjéket elektro-blottal (Bio-Rad, 20 V, 4 h) transzferáltuk polivinil-difluorid membránra (Millipore). A filtereket blokkoló pufferben [10% (w/v) tejpor, TBS-Tween ( 50 mM Tris pH: 9.5, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween 20)] inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 óráig. A következő lépésben a filtert a megfelelő elsődleges ellenanyag jelenlétében (10 µg/ml ellenanyag, 2 % (w/v) tejpor, TBS-Tween) inkubáltuk 4 °C-on 16 óráig. Az egyes fehérjék immunodetektálására a GFP ellen egérben kifejlesztett monoklonális ellenanyagokat használtuk (Anti-Green Fluorescent Protein (Sigma)). Ez az antitest megfelelő érzékenységgel és specifitással ismeri fel az YFP fehérjét, amely a GFP egy mutáns variánsa. Az inkubáció után a filtert alkalikus-foszfátázhoz kapcsolt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk [1:1000 arányban hígított "Anti-Mouse IgG AP-

conjugate", 2 % (w/v) tejpor, TBS-Tween] szobahőmérsékleten 1 óráig. Ezt követően a filtert TBS-Tween pufferben, majd alkalikus-foszfát szubsztrát pufferben (0.1 M Tris pH: 9.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) öblítettük át, majd megfelelő szubsztrátoldatban [0.02 % (w/v) BCIP, 0.03 % (w/v) NBT, szubsztrát pufferben] inkubáltuk, míg a fehérje-sávok láthatóvá nem váltak. A reakciót desztillált vizes öblítéssel leállítottuk, majd a filtert megszártítottuk.

#### **4.2.8. Kromofór-kötés vizsgálata (Zinc Blot analízis)**

Kromofórként 4 µM fikocianobilin volt inkubálva a megtisztított rekombináns GST-B651, GST-450, ill a GST-410 fehérjével (Lagarias és Lagarias, 1989). Mindegyik apoprotein *Escherichia coli*-ban volt kifejezve és egy glutathione-Sepharose 4B oszlopon feldolgozva. A kromofór-kötő fehérjék Zn<sup>2+</sup> által indukált fluoreszcenciája UV fény alatt láthatóvá válik az Oka és mtsai. (2004) által leírt SDS/PAGE elválasztás után.

### **4.3. Növényeken alkalmazott technikák**

#### **4.3.1. Magsterilizálás, növénynevelés**

A sterilizálandó magokat vízben áztattuk, és 2 napig 4°C-on tároltuk. Ezután 10 percig 5%-os (w/v) kalcium-hipoklorit oldatban sterilizáltuk, majd steril desztillált vízzel ötször átmostuk. A mosás után a steril magokat a kívánt táptalajra szélesztettük.

Ezt követően a növényeket 12 h fehér fény/12 h sötétben, 22°C-on neveltük steril körülmények között. A méréseket 22°C-on végeztük el. A megvilágításra használt fényt fluoreszcens fénycsővek, a monokromatikus vörös (667 nm) fényt a Quantum Devices Inc (USA) Snaplite LED (Light Emitting Diode) lámpákat tartalmazó fényforrások biztosították.

#### **4.3.2. Transzgenikus növények előállítása (Clough és Bent, 1998)**

Az *Arabidopsis* növények transzformációja során a Clough és Bent (1998) által kifejlesztett virág-infiltrációs módszert alkalmaztuk. A megfelelő *Agrobacterium* törzset karbenicillinnel kiegészített YEB tápoldatban (300 ml) növesztettük 25°C-on 2 napig (OD<sub>600</sub>=2,5-3,0). Az *Agrobacterium*ot centrifugálással (4000 G, 20 perc, 25°C) gyűjtöttük össze, majd 3 ml YEB oldatban felfuszpendáltuk. Ezután folyamatos kevergetés mellett 300 ml 3%-os szaharóz oldatot, végül 40 µl Silwet L-77-et (Lehle Seeds) adtunk a

baktérium-szuszpenzióhoz. Ez utóbbi vegyület szilikon-poliéter kopolimerek keveréke, amely az általunk használt koncentrációban nem mérgező, viszont fokozza a növényi szövetek nedvesíthetőségét, így növeli az *Agrobacterium* által közvetített géntranszfer hatékonyságát.

A transzformálandó, üvegházban felnevelt *Arabidopsis* növények teljes virágzatát 15 másodpercre a baktérium-szuszpenzióba mártottuk, majd a növényeket 1 napig fóliával letakarva inkubáltuk, így biztosítva a magasabb relatív páratartalmat a számukra. Ezalatt a bináris vektor T-DNS szakasza (így a T-DNS-be épített génkonstrukció is) különböző sejtek (pl. a petesejt) genomjába integrálódott. Ez azt jelenti, hogy azok az egyedek, amelyek egy „transzformáns” petesejt megtermékenyítése révén jönnek létre, valamennyi sejtjükben hordozzák az adott transzgént (heterozigóta formában). A felnevelt növényekről magot gyűjtöttünk. Majd a magokat sterilizálás után higromicinnel és klaforánnal kiegészített AM táptalajon csíráztattuk. A szelekciós ágens jelenlétében csak a transzformáns egyedek képesek megfelelően fejlődni, így kiválasztásuk viszonylag egyszerű. Miután a kiválasztott csíranövények (T1 nemzedék) megerősödtek és megfelelő gyökérzetet fejlesztettek a friss táptalajon, földbe ültettük és a mag éréséig üvegházban neveltük őket. Minden konstrukció esetében 20-30 független T1 transzformáns vonalat állítottunk elő. Kísérleteinket a transzgénre nézve homozigóta T3 nemzedék azon egyedein végeztük el, melyek a transzgént 1 kópiában hordozzák.

#### **4.3.3. *In vivo* lumineszcencia-mérés luminométerrel (Millar és mtsai, 1992)**

A transzgenikus csíranövényeket 12 h fény/12 h sötét fénycikluson, 22°C-on neveltük MS3 táptalajon, 7 napig. A mérés kezdete előtt min. 6 órával a csíranövényeket steril körülmények között egyenként egy 96 zsebes mikrotiter lemezbe helyeztük, amelynek minden zsebe 0,25 ml MS3 táptalajt tartalmazott. Minden növényre 20 µl 2 mM-os luciferin oldatot cseppentettünk. A méréseket Topcount automatizált luminométerrel (Packard) végeztük, amely a csíranövények által kibocsátott lumineszcenciát 1-2 óránként rögzítette, a mérési idő végéig (2-7 nap). A mérés a csírázást követő 7. napon indult, a nevelés során alkalmazott fényciklusoknak megfelelően a fény-sötét átmenet pillanatában. A növények lumineszcenciáját az első 12 óra során folyamatos sötétben mértük. Ezt követően a mintákat fény/sötét cikluson tartottuk. A fényben mért minták csupán a mérések alkalmával (1-2 óránként 8 percre) kerültek a sötét mérőtérbe, ami nem

befolyásolja a cirkadián óra működését (Miller és mtsai, 1995). A mérési eredmények feldolgozása a TopTempII elnevezésű Microsoft Excel makro-programmal (Dr. Andrew Millar, University of Edinburgh, UK ajándéka) történt. A luminométer által mért lumineszcencia értékek az egy másodperc alatt beérkezett fotonok számát (cps = count per seconds) mutatják. Az egyes csíranövény által egy adott időpontban kibocsátott lumineszcencia értéket, a teljes mérés során kibocsátott lumineszcencia átlagával osztottuk el, így kaptuk meg az adott időponthoz tartozó normalizált lumineszcencia értéket. Az ábrákon legalább 16 csíranövény normalizált lumineszcencia értékéből számolt átlagértéket tüntettük fel. Ezeket az adatokat az idő függvényében ábrázoltuk.

#### ***4.3.4. Luciferáz enzimaktivitás meghatározása CCD kamerával***

Luciferáz riportergén konstrukciót tartalmazó transzgenikus csíranövényeket MS3 táptalajon sötétben neveltünk 1 hétig. A csírázás kezdetét követő hetedik napon a növényeket 1 mM luciferin oldattal permeteztük le, majd több napon keresztül mértük sötétben a növények lumineszcenciáját egy folyékony nitrogénnel hűtött, nagy érzékenységgű CCD kamerával (LN-CCD-512-TKB, Princeton Instruments, USA). A csíranövények luciferinnel történt kezelése után 24 órával a mintákat – a kontroll minta kivételével – különböző hullámhosszú fénnel kezeltük, majd visszahelyeztük azokat a kamerába, azaz a sötétbe. A csíranövényekről félóránként digitális felvételt készítettünk, melyeket a MetaView szoftverrel (Universal Imaging, USA) elemeztünk. A mérés során kapott fényintenzitás értéke arányos a minta luciferáz aktivitásával, azaz a riportergén kifejeződésével. Ebből az értékből levonva a digitális kamera „zaj-háttérét”, megkapjuk a relatív aktivitásértéket, amelyet grafikonon ábrázoltunk (Excel szoftver, Microsoft).

#### ***4.3.5. Periódushossz adatok számolása***

Minden általunk vizsgált ritmikus folyamat periódushosszának analízisét a Biological Rhythms Analysis Software System (BRASS, Southern és Millar, 2005) segítségével készítettük el, amelyet Dr. Andrew Millar-tól (University of Edinburgh, UK) és munkatársaitól kaptunk a csoport. A Microsoft Excel alapú makro program képes az automatizált luminométer és a CCD kamera használata során nyert adatok kiértékelésére. A BRASS program Fast Fourier Transform-Non Linear Least Squares analízisével (FFT-NLLS, Plautz és mtsai, 1997) megbecsülhetjük a kísérletben vizsgált növények

periódushosszát, az egyes növények ritmusára illesztett görbe alapján. A periódushossz meghatározásához minden kísérletben minimum 80, maximum 120 órás mérési időtartamból származó adatokat használtunk fel. A periódushossz középértékének becslése során csak azokat a periódushossz értékeket vettük figyelembe, amelyek 15 és 38 óra közé estek. Az azonos genotípusba tartozó, legalább 20 növény periódushosszának statisztikai elemzését a BRASS programmal végeztük.

#### **4.3.6. Hipokotilhossz mérése**

A magokat sterilizálás után MS0 táptalajra szélesztettük, majd a lemezeket 3 napra 4 °C-os hűtőszekrénybe helyeztük. Ezután a magok 22 °C-ra kerültek és csírázást indukáló 3-6 órás fehér fénykezelést ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kaptak. Majd 18-21 óra sötét, végül a megfelelő intenzitású és hullámhosszú fénykezelés (vagy sötét) következett. A kezelés 4. napján a csíranövényeket 1%-os (w/v) agar lemezre fektettük, és digitális képet készítettünk róluk. A képet a MetaMorph szoftverrel (Universal Imaging, USA) dolgoztuk fel, a statisztikai elemzést pedig az Excel szoftver (Microsoft) segítségével végeztük. Minden növényvonal ill. alkalmazott fényintenzitás esetében minimum 30 növény hipokotilhosszát mértük meg. A hipokotilhossz normalizált értékét úgy kaptuk, hogy minden mérési ponthoz tartozó átlag hipokotilhossz értéket (mm) elosztottuk az adott vonalhoz tartozó, sötétben mért hipokotilhossz értékkel (mm). A hipokotilhoszak normalizált értékeit grafikonokon ábrázoltuk.

#### **4.3.7. Virágzási idő meghatározása**

A magokat 2 napig 4 °C-on sötétben inkubáltuk a talajban. Utána hosszúnappalos körülményekre (16 óra fehér fény/ 8 óra sötét) helyeztük át azokat. A  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású fényt fluoreszcens (hideg-fehér) fénycsővek biztosították. A virágzási időt a rozetta levelek számával határoztuk meg. A kísérletet kétszer ismételtük meg, genotípusonként 30-40 növény felhasználásával.

#### **4.3.8. Fény, fluoreszcens és konfokális mikroszkópia**

A kívánt fénykezelés után a növényi mintákat (csíranövény, levéldarab, epidermisznyúzat) üveg tárgylemezre cseppentett vízbe helyeztük, fedőlemezrel lefedtük, majd egy



Axiovert típusú (Zeiss, Németország) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A GFP molekulákat a mikroszkópba épített UV fényforrás segítségével és a FITC (fluorescein izo-tiocianát) filterek alkalmazásával gerjesztettük. A reprezentatív sejtekről felvételeket készítettünk, majd a képeket digitalizáltuk a további számítógépes feldolgozás céljából.

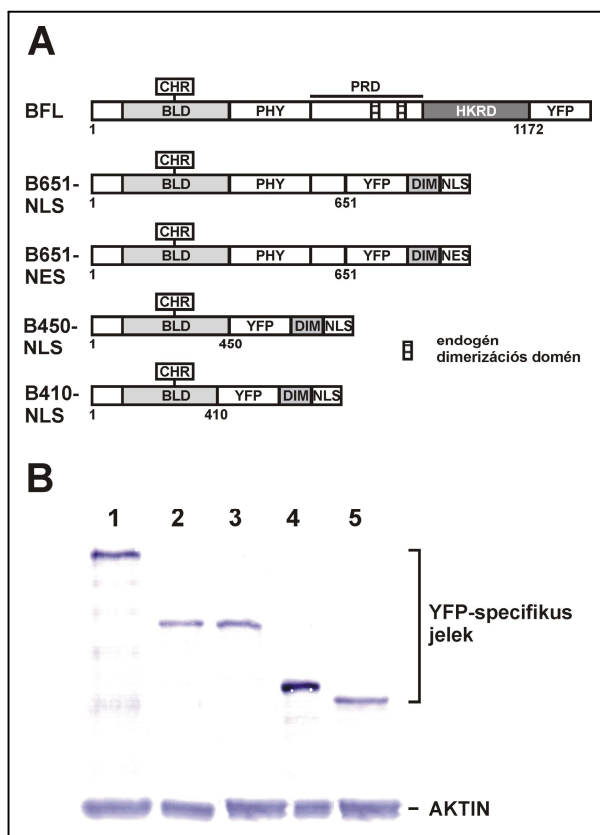
A konfokális képeket egy lézer-pásztázó konfokális mikroszkóppal készítettük el (Leica, Németország; típus: DM RBE TCS4D) a következő paraméterekkel: két-csatornás pásztázás argon-kripton lézerrel (gerjesztési hullámhossz: 448 nm, nyaláb-osztó: 510 nm, megfigyelő szűrő: 515 nm) (Kircher és mtsai, 1999).

A digitalizált és konfokális képek minőségét (fényerősség, kontraszt) a CorelPhotopaint 8.0 programmal javítottuk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az N-terminális PHYB fragmentumok szerkezete, kifejeződése és sejten belüli elhelyezkedése

Kísérleteink során PHYB fehérje különböző hosszúságú, 651, 450 és 410 aminosavat tartalmazó N-terminális csonkolt változatait vizsgáltuk. A PHYB változatok különböző fúziós fehérjemotívumokat hordoztak. Az YFP (yellow fluorescent protein, sárga fluoreszcens fehérje) a fehérjék sejten belüli elhelyezkedésének meghatározását tette



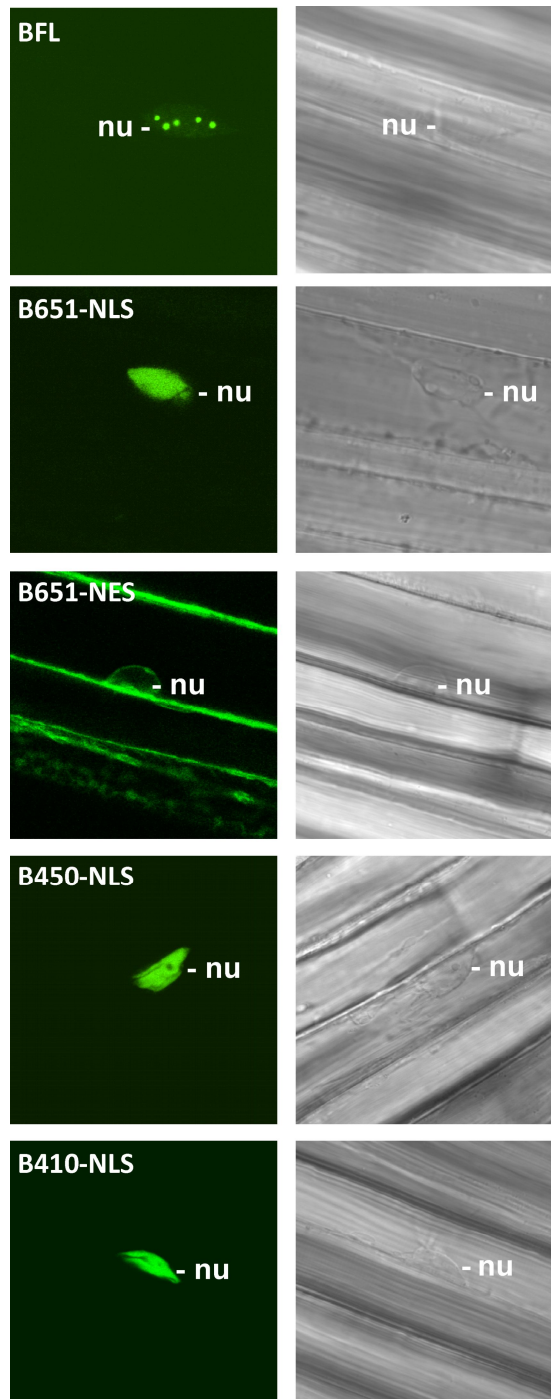
**5.1. ábra. A csonka PHYB szakaszokat tartalmazó fúziós fehérjék szerkezete és kifejeződése.**

**A**, A csonkolt PHYB konstrukciók sematikus ábrázolása. BLD, bilin liáz domén; CHR, kromofór; PHY, fitokróm domén; PRD, PAS-szerű domén; HKRD, hisztidin kináz-szerű domén; DIM, dimerizációs domén. Valamennyi PHYB változat kifejeződését a karfiolmozaik vírusból származó, konstitutívan aktív 35S promóter irányította.

**B**, A fúziós fehérjék kifejeződésének vizsgálata Western-blot analízissel. A BFL (1. sáv), a B651-NLS (2. sáv), a B651-NES (3. sáv), és a B-450-NLS (4. sáv) vonalak 12 óra fény/12 óra sötét cikluson növekedtek 7 napig a mintavételt megelőzően. A PHYB fúziós fehérjék detektálására GFP-specifikus ellenanyagot használtunk.

lehetővé. A fitokrómok csak dimer formában képesek betölteni fotoreceptor szerepüket. Mivel az ehhez szükséges dimerizációs motívumok a fitokrómok C-terminális részén találhatók, a CPRF2 (common plant regulatory factor 2, általános növényi szabályozó faktor 2) transzkripció faktorból származó dimerizációs domént (DIM) kapcsolunk valamennyi fúziós fehérjéhez. Az NLS (nuclear localisation signal, sejtmagi lokalizációs jel), vagy a NES (nuclear export signal, sejtmagi export jel) lehetőséget adott annak vizsgálatára, hogy az egyes PHYB fragmentumok funkciója függ-e a sejten belüli elhelyezkedéstől. Valamennyi változatot

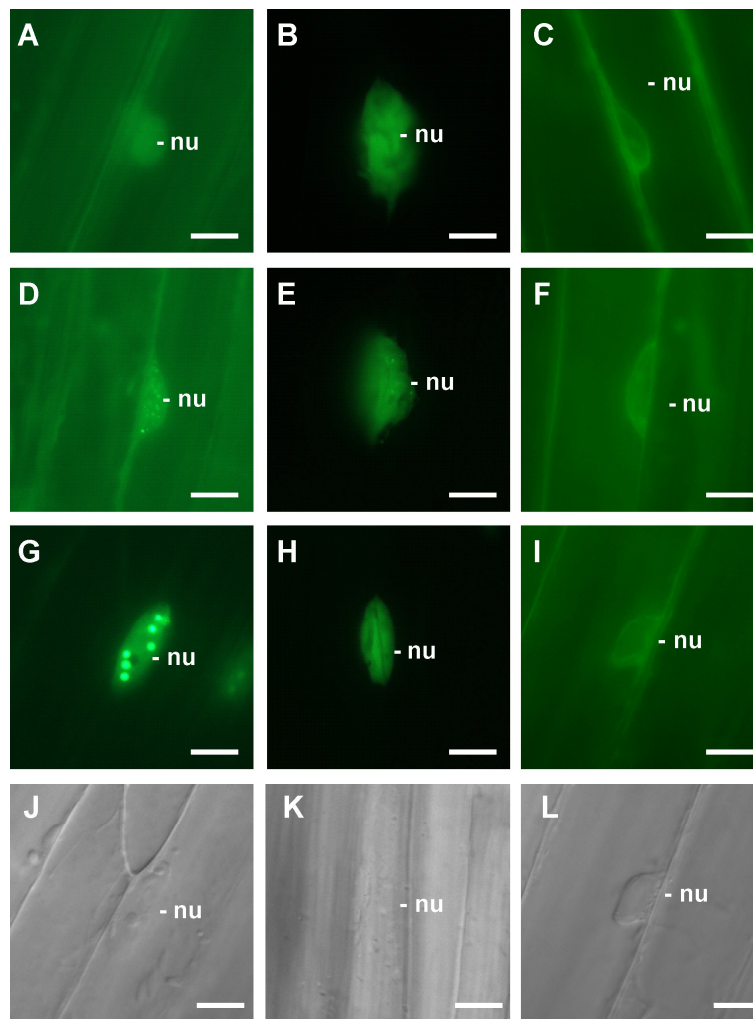
egy funkcióvesztéses phyB mutánsban (*phyB-9*) fejeztettük ki. A transzgenikus vonalak rövid nevei az expresszált fehérjék szerkezetére utalnak (B651-NLS, B651-NES, B450-NLS és B410-NLS). Pozitív kontrollként használtuk a vad típusú, teljes hosszúságú PHYB fehérjét YFP-vel összekapcsolva (BFL). Az **5.1.ábrán** látható a fúziós proteinek



**5.2. ábra. A PHYB fragmentumok sejten belüli elhelyezkedése.**

A bal oldali, konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek mutatják a különböző PHYB variánsok kifejeződését a hipokotil epidermisz sejtjeiben. A 4 napos etiolált növények 24 órás vörös fénykezelést kaptak a mikroszkópos vizsgálat előtt. A konfokális felvételek kb. 1  $\mu\text{m}$ -es optikai metszetből mutatják az YFP fluoreszcenciát. A jobb oldalon láthatóak a megfelelő, áteső fényben készült referencia felvételek. Az egyes képek 48 $\times$ 48  $\mu\text{m}$ -es területet képviselnek. nu, nucleus (sejtmag).

és a vad típusú PHYB receptor jellegzetes doménekből felépülő szerkezete. A 120 kDa PHYB két fő doménből épül fel. Az N-terminális vég első szakasza a Pfr konformáció stabilitásának szabályozásában játszik szerepet (Sweere, 2001; Trupkin, 2007). A bilin liáz motívum (BL) hordozza a kovalens kötéssel kapcsolódó tetrapirrol kromofór fitokromobilint (CHR). Ez a motívum olyan enzimatis funkcióval is rendelkezik, ami felelős a kromofór kapcsolásáért. A fitokróm domén (PHY) Pfr forma fennmaradásához szükséges (Montgomery és Lagarias, 2002). A C-terminális első felét PAS-szerű doménnek (PAS Related Domain) nevezzük, amely két PAS-szerű al-domént tartalmaz: a Quail-boxnak nevezett központi szabályozó régiót és a dimerizációs motívumokat. A fehérje C-terminálisán található hisztidin-kináz-szerű domén (Histidine Kinase Related Domain) nagyfokú hasonlóságot mutat a bakteriális kétkomponensű receptor kinázokkal (Rockwell, 2006). Valamennyi PHYB-változatra nézve számos független transzgenikus vonalat hoztunk létre. Ezek közül választottuk ki a további vizsgálatokra szánt vonalakat. A különböző PHYB fragmentumok megfelelő kifejeződését Western-blot analízissel vizsgáltuk (**5.1.B ábra**). Látható, hogy a különböző PHYB változatok hasonló szinten fejeződtek ki, bár a B450-NLS a többi változatnál kissé magasabb fehérjeszintet mutatott. A fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedését epifluoreszcens és konfokális lézer scanning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A konfokális felvételek az **5.2. ábrán** láthatóak. E módszer lehetővé teszi a minták optikai szeletelését, aminek eredményeképpen a megjelenített mikroszkópos kép a vizsgált tárgy mindössze 1 µm vastagságú metszetéből származik. Ezek alapján állíthatjuk, hogy az YFP fluoreszcencia jelek az NLS-t tartalmazó változatok esetében ténylegesen a sejtmagból, míg a NES-t hordozó változat esetében a sejtmagon kívülről származnak. Megfigyelhető továbbá, hogy a korábban leírt adatoknak megfelelően (Kircher és mtsai, 2002) a BFL fehérjék a sejtmagban helyezkednek el ún. sejtmagi testeket formálva a 24 órás vörös fénykezelést követően. Az epifluoreszcens felvételeket az **5.3. ábra** mutatja. A képek jól szemléltetik, hogy a fényindukált sejtmagi import és a sejtmagi testek kialakulása csak a BFL fehérjékre jellemző. A B651-NLS vagy B651-NES fehérjék sejten belüli eloszlását a fény nem befolyásolta.



**5.3. ábra. Az NLS/NES-kapcsolt PHYB fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedése nem függ a fényviszonyoktól.**

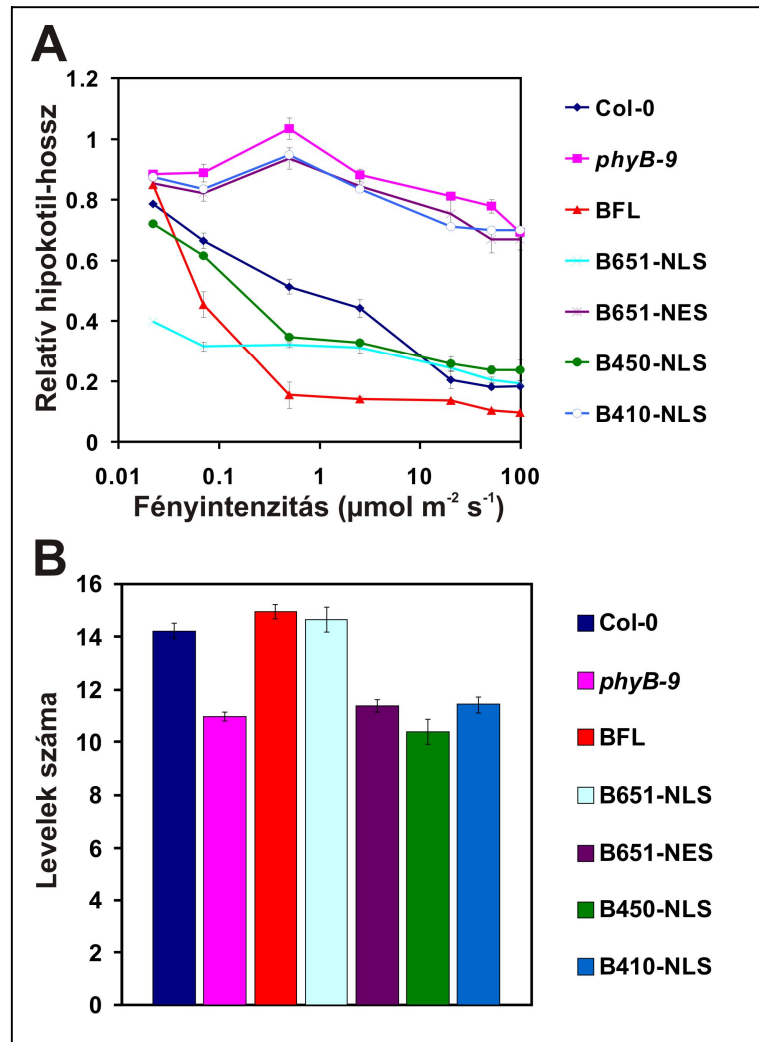
Epifluoreszcens felvételek láthatóak a BFL (A, D, G), a B651-NLS (B, E, H) vagy a B651-NES (C, F, I) fúziós proteinek kifejeződéséről a *phyB-9* transzgenikus vonalak hipokotiljának epidermisz sejtjeiben. A 4 napos csíranövényeket végig sötétben tartottuk (A, B, C), vagy 5 (D, E, F) ill. 10 perces vörös fénnel kezeltük (J, K, L) a mikroszkópos vizsgálat előtt. A (G, H, I) fluoreszcens felvételeknek megfelelő referencia-képeket a (J, K, L) panelek szemléltetik. A mérőskála 10 $\mu$ m, a nu a sejtmagot jelöli.

## 5.2. Az egyes PHYB-változatok eltérő módon komplementálják a *phyB-9* növények fotomorfogenikus és virágzási idő fenotípusát

Első lépésben megvizsgáltuk a különböző PHYB fúziós fehérjék hatását a hipokotil megnyúlás gátlására. A magokat különböző intenzitású vörös fényen neveltük 4 napig, majd megmértük a hipokotilhosszukat. Az **5.4. A ábrán** láthatjuk, hogy a BFL, a B651-NLS és a B450-NLS komplementálták a *phyb-9* növényekre jellemző hosszú hipokotil fenotípust, míg a B651-NES és a B410-NLS hatástalanok voltak. A BFL csaknem minden intenzitás mellett rövidebb hipokotilt mutatott, mind a megfelelő Columbia-0 (Col-0) vad típusú növények (hiper-érzékenység). A B651-NLS és a B450-NLS hiper-érzékenysége a közepes intenzitású vörös fényen is tapasztalható, de leginkább az alacsony intenzitásnál volt megfigyelhető. Hasonló eredményeket kaptunk, amikor a növényeket folyamatos fehér fényben vagy fény/sötét cikluson neveltük.

A *PHYB* gén mutációi korai virágzást okoznak hosszú nappalon (Neff és Chory, 1998), rövid nappalon, sőt folyamatos fényben is (Endo és mtsai, 2005). Megvizsgáltuk, hogy a csonkolt PHYB fragmentumok hogyan képesek a *phyB-9* növényekre jellemző korai virágzás fenotípust helyreállítani. A növényeket hosszú nappalon (16 óra fény/ 8 óra sötét) neveltük, majd mikor a virágzati tengely kb. 1 cm hosszúságú volt, megszámoltuk a rozetta leveleket, ami a virágzási idő mérésének elfogadott formája. Az **5.4. B ábra** szemlélteti, hogy a BFL és a B651-NLS változatok ugyanakkor virágoztak, mint a vad típusú növények, de a B651-NES, a B450-NLS és a B410-NLS verziók nem mutattak különbséget a *phyB-9* növényekhez képest a virágzási időben.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PHYB 651 aminosavat tartalmazó N-terminális darabja úgy viselkedik, mint egy működőképes fotoreceptor, amennyiben a sejtmagban található. A B410-NLS viszont nem elegendő a vizsgált fényfüggő fiziológiai folyamatok szabályozásához. Érdekes módon, a B450-NLS képes volt a jelátvitelre a hipokotil megnyúlás gátlását illetően, azonban nem működött a virágzási idő szabályozásánál.



5.4. ábra. A *phyB-9* növények fotomorfenikus és virágzási idő fenotípusának helyreállítása N-terminális PHYB fragmentumok kifejeztetésével.

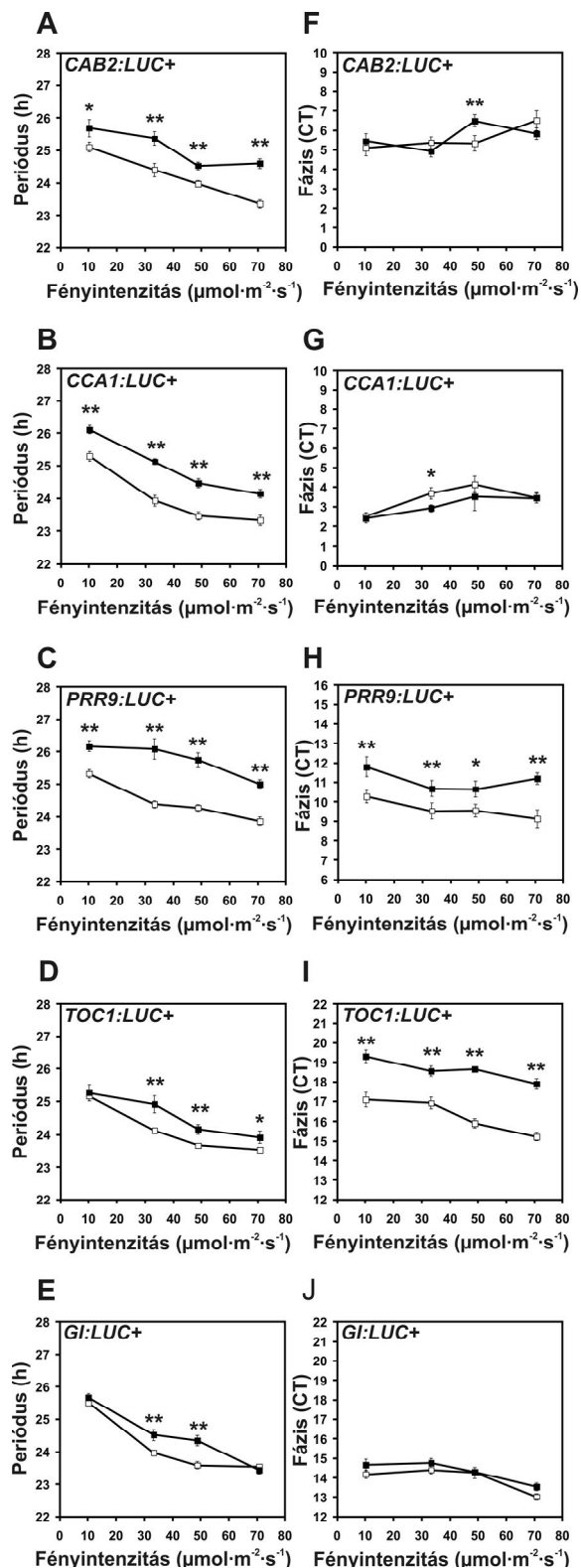
**A**, A vörös fény hipokotil megnyúlást gátló hatásának intenzitásfüggése (FRC, Fluence rate Response Curve). A vad típusú (Col-0) növényeket, a *phyB-9* mutánsokat és a PHYB csonkolt darabjait *phyB-9* háttérben kifejező transzgenikus vonalakat 4 napon keresztül, folyamatos vörös fényben neveltük, majd megmértük azok hipokotil hosszát. Az értékeket a végig sötétben nevelt növények hipokotil hosszára normalizáltuk.

**B**, A hosszúnappalra fejlődött növények virágzási ideje (16 óra fehér fény/8 óra sötét). A virágzási időt a szárba induláskor megjelent rozetta levelek számával határoztuk meg. A hibásávok az átlag szórását mutatják (SE).

### 5.3. A *phyB-9* mutáció hatása a központi óraelemek ritmikus kifejeződésére

Korábbi kísérletekből ismeretes, hogy a PHYB hiánya nemcsak a fotomorfogenezis és a virágzás szabályozását érinti, hanem zavart okoz a cirkadián óra működésében is, ami a *CAB:LUC* marker esetében hosszú periódust eredményez közepes és magas intenzitású folyamatos vörös fényben (Somers és mtsai, 1998). Mivel a *CAB:LUC* ritmikus kifejeződését az óra irányítja, ezért joggal feltételezték, hogy a PHYB hiánya az órakomponensek expresszióját is hasonló módon befolyásolja. Ezen feltételezések igazolására elkészítettük a *CAB:LUC+*, a *CCA1:LUC+*, a *TOC1:LUC+*, a *GI:LUC+* és a *PRR9:LUC+* markereket Col-0 és *phyB-9* háttérben, majd különböző intenzitású folyamatos vörös fényt alkalmazva vizsgáltuk meg ezek kifejeződésének szabadonfutó periódushosszát és cirkadián fázisát. Növényekben, a cirkadián ritmusok periódushossza fordítottan arányos a folyamatos fény intenzitásával (Aschoff szabály, Aschoff 1960). Az **5.5. ábra** mutatja, hogy az Aschoff szabálynak megfelelően, minden marker esetében csökkent a periódushossz a fényintenzitás növelésével, vagyis a *phyB-9* mutáció nem törölte el teljesen ezt a választ. A várakozásoknak megfelelően az óragének kifejeződése hosszú periódust mutatott a *phyB-9* növényekben a vizsgált fényintenzitások többségénél. Ugyanakkor a *phyB-9* mutáció fényintenzitás-függő hatása alapján a vizsgált óragéneket két csoportba sorolhatjuk. A *CCA1:LUC+* és a *PRR9:LUC+* hosszabb periódust (kb. 1 óra különbséget) mutatott a *phyB-9* növények esetében a Col-0 növényekhez viszonyítva, valamennyi fényintenzitásnál (**5.5.B és C ábra**). Ellenben, a *TOC1:LUC+* és a *GI:LUC+* esetében kisebb, de szignifikáns periódus különbség (kb. 0.5 óra) mutatkozott a mutáns és vad típusú növényeket összehasonlítva (**5.5.D és E ábra**). Meglepő módon, a *phyB-9* háttérű *GI:LUC+* növényeknél nem tapasztaltunk periódushossz növekedést az általunk vizsgált legmagasabb intenzitásnál. Ugyanezen körülmények mellett a *TOC1:LUC+* kifejeződése hosszabb periódust mutatott a *phyB-9* esetében, bár ez a különbség nem volt olyan jelentős, mint alacsonyabb intenzitások mellett. A *CCA1:LUC+* és a *PRR9:LUC+* különböző intenzitásoknál meghatározott periódushosszainak görbéi hasonló jellegűek voltak a *CAB:LUC+* cirkadián kimeneti marker periódushosszához a **5.5.A ábra** viszonyítva. A *phyB-9* mutáció ezen kívül hatással van a különböző marker gének ritmikus kifejeződésének fázisára. A *PRR9:LUC+* és a *TOC1:LUC+* 1-2 órás fáziskésést mutatott *phyB-9* háttérben az általunk használt besugárzás hatására (**5.5.H és I ábra**). Ellenben, a *CAB:LUC+*, a *CCA1:LUC+* és a *GI:LUC+* markerek nem mutattak jelentős fázisváltozást a kifejeződésüket illetően (**5.5.F, G és J ábra**).





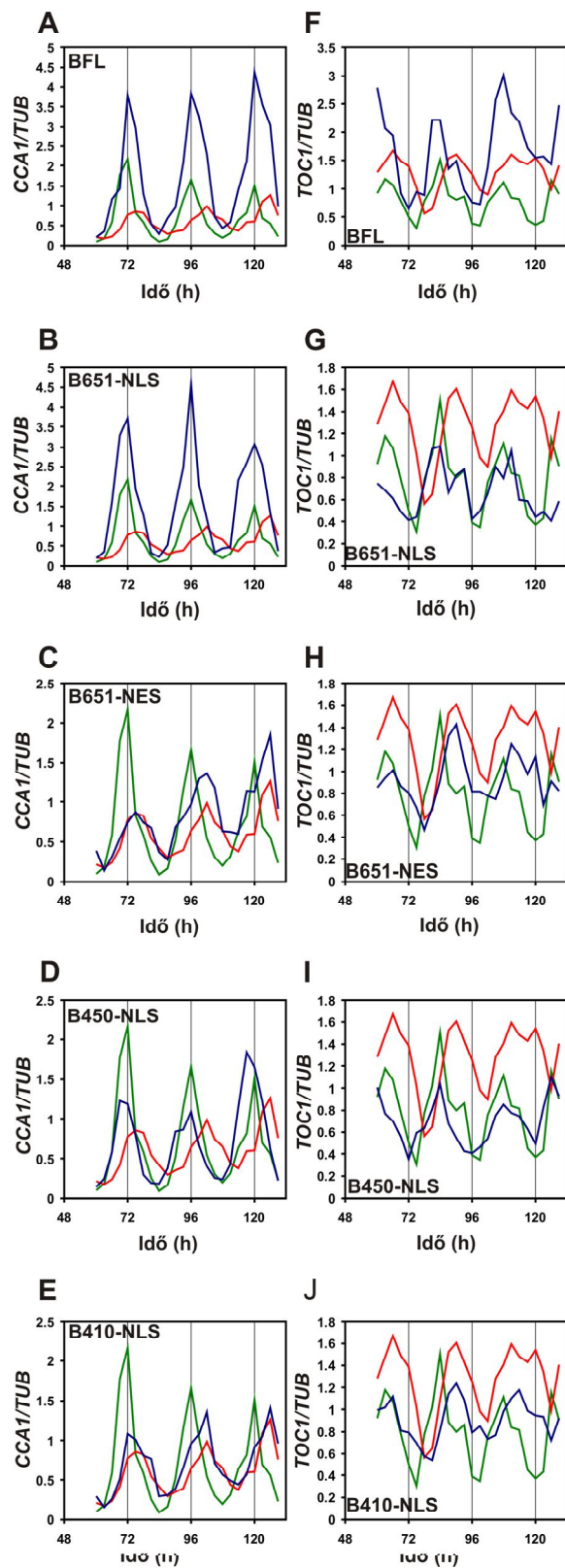
### 5.5. ábra. A *phyB-9* növények cirkadián fenotípusának vizsgálata folyamatos vörös fényben.

Vad típusú Col-0 (fehér négyzet) és *phyB-9* mutáns (fekete négyzet) háttérben kifejezett *CAB:LUC+* (A és F), *CCA1:LUC+* (B és G), *PRR9:LUC+* (C és H), *TOC1:LUC+* (D és I), vagy *GI:LUC+* (E és J) növényeket 7 napon keresztül, 12 óra fehér/12 óra sötét cikluson tartottuk, majd különböző intenzitású folyamatos vörös fénybe helyeztük őket. Meghatároztuk a ritmikus lumineszcencia-változások szabadonfutó periódushosszát (A-E), és fázisát (F-J). A fázis értékeit a cirkadián időben (CT) fejeztük ki (korrekció a periódushosszra nézve). A hibaszávok az átlag szórását mutatják (SE). Az adatokat kétmintás t-próbával elemeztük (Student's t-test). A Col-0 és a *phyB-9* közötti statisztikailag jelentős különbséget csillaggal jelöltük. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

Ezekből az eredményekből arra következtetünk, hogy a PHYB különböző minőségű és/vagy erősségű bemeneti jelet továbbít a növényi cirkadián óra központi oszcillátorának reggeli (*CCA1*, *PRR9*) ill. esti (*TOC1*, *GI*) szabályozó köreihez, ami végső soron a két szabályozó kör szétkapcsolódásához vezethet bizonyos körülmények (fényviszonyok) mellett.

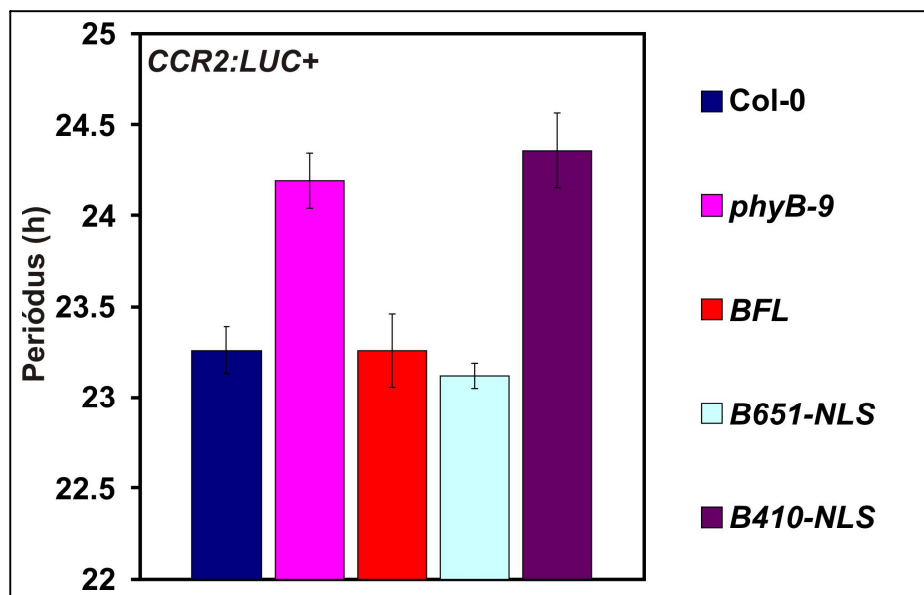
#### 5.4. A különböző PHYB-változatok cirkadián funkciójának vizsgálata állandó vörös fényben

A következő kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a PHYB receptor melyik szakasza szükséges a cirkadián órát szabályozó vörös fényjelek közvetítéséhez. Ennek érdekében végeztük el a *CCA1* és *TOC1* mRNS ritmusok analízisét kvantitatív valós idejű PCR segítségével vad típusú, *phyB-9*, ill. a különböző komplementált vonalakban. Kísérleti körülményként közepes intenzitású folyamatos vörös fényt ( $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) alkalmaztunk, mivel előző eredményeink alapján valamennyi óragén transzkripciója periódushossz-változást mutatott ilyen körülmények mellett (**5.5. B-E ábra**). A mintavételt a folyamatos vörös fény bekapcsolását követő 60. órától kezdtük, majd 3 órás gyakorisággal folytattuk 3 napig. Az **5.6. ábrán** tisztán kivehető, hogy a *CCA1* és a *TOC1* gének kifejeződése hosszabb periódust mutat a *phyB-9* növények esetében, ami alátámasztja az eddigi eredményeinket (**5.5.B és D**). Látható az is, hogy a PHYB hiányában a *CCA1* kifejeződés ritmusának amplitúdója kisebb lett, de a *TOC1* kifejeződés amplitúdója nem csökkent jelentősen. A BFL, a B651-NLS és a B450-NLS teljesen helyreállították a vad típusra jellemző periódust a *CCA1* és *TOC1* esetében is, azonban a B651-NES és a B410-NLS a *phyB-9* mutánsra jellemző fenotípust mutatták. Ezen túlmenően, a *CCA1* és a *TOC1* kifejeződés amplitúdója jelentősen megnövekedett a BFL növényekben (**5.6.A és F**). A B651-NLS csak a *CCA1* kifejeződés amplitúdójában mutatott hasonló növekedést (**5.6.B ábra**), míg a többi PHYB verzió hatástalan volt a ritmikus mRNS akkumuláció amplitúdójára. A periódushossz a cirkadián órák működését leíró kvantitatív jelleg, de becslése nehéz és pontatlan, ha csak ritmikus mRNS adatok állnak rendelkezésre. Annak érdekében, hogy az egyes PHYB verziók komplementációs képességét precízen összehasonlíthassuk, a *CCR2:LUC* + markert építettük be a különböző háttérű növényekbe. Az **5.7. ábra** mutatja a folyamatos vörös fénnel ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) besugárzott növények *CCR2:LUC+* kifejeződésének periódushosszait. A *CCR2:LUC+* kifejeződés periódusa körülbelül 1 órával volt hosszabb a *phyB-9* háttérű növényekben a vad típushoz viszonyítva. A mRNS adatokkal egyezően a BFL és a B651-NLS teljes mértékben komplementálta ezt a fenotípust, míg a B410-NLS nem. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PHYB N-terminális szakaszának első 450 aminosavat tartalmazó része teljesen aktív a folyamatos vörös fény órához történő jelátvitelében, továbbá, hogy ezt a funkciót a PHYB csak a sejtmagban képes ellátni.



**5.6. ábra. A *phyB-9* növények hosszú periódus fenotípusának helyreállítása N-terminális PHYB fragmentumok kifejeztetésével folyamatos vörös fényben.**

A vad típusú Col-0, a mutáns *phyB-9*, és a *phyB-9* háttérben BFL (A és F), B651-NLS (B és G), B651-NES (C és H), B450-NLS (D és I) és B410-NLS (E és J) fehérjéket kifejező transzgenikus vonalakat 7 napon keresztül 12 óra sötét/12 óra fény cikluson, majd  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású folyamatos vörös fényben neveltük. A mintákat a vörös fény bekapcsolását követő 60. órától kezdtük el szedni, 3 óránként. A *CCA1* (A-E) és a *TOC1* (F-J) mRNS szinteket qRT-PCR segítségével határoztuk meg. Az ábrák a *TUBULIN2/3* szintekkel normalizált értékeket mutatják. Az egyes görbék a Col-0 (zöld vonal), a *phyB-9* (piros vonal), és a komplementáló vonalak (kék vonal) adatait ábrázolják.



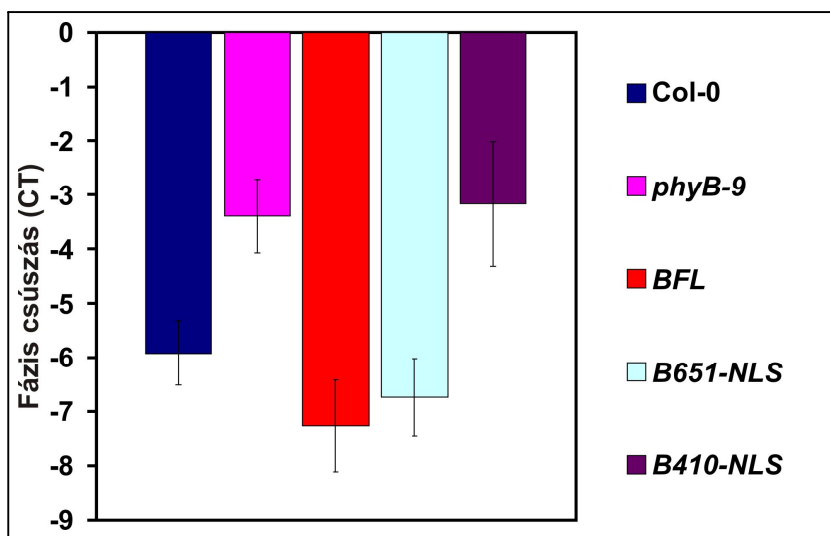
**5.7. ábra. A *phyB-9* növények komplementációjának kvantitatív analízise.** A *CCR2:LUC+* cirkadián markert beépítettük a Col-0, a *phyB-9*, a *BFL*, a *B651-NLS* és a *B410-NLS* háttérű növényekbe. A növényeket 12 óra fehér fény/12 óra sötét körülmények között tartottuk 7 napig, majd  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású folyamatos vörös megvilágítást alkalmaztunk. A *CCR2:LUC+* lumineszcenciát 2 óránként mértük, majd a mérés végeztével meghatároztuk a periódushosszt. A hibásávok az átlag szórását mutatják (SE).

## 5.5. A PHYB által közvetített vörös fény pulzusok hatása az óra beállítására

A sötétben szabadonfutó cirkadián óra a rövid fény besugárzásokra jellegzetes fázis eltolódásokkal válaszol. Ez az eltolódás „késés” vagy „sietés” lehet, attól függően, hogy az óra fázisa épp milyen időt mutat, amikor a fény pulzust megkapja. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a szubjektív éjszaka első felében alkalmazott besugárzás fáziskésést, míg a szubjektív nappal második felében vagy a szubjektív nappal első részében adott fénykezelés pozitív fáziscsúszást (sietést) okoz (Covington és mtsai, 2001). Yanovsky és munkatársai kimutatták, hogy a PHYB szerepet játszik a cirkadián órát érintő vörös fény-pulzusok közvetítésében, mivel egy PHYB-hiányos mutánsban a levélmozgás ritmusa jelentősen kisebb mértékű fáziscsúszást mutatott a fénykezelést követően, mint a megfelelő vad típusban (Yanovsky és mtsai, 2001). Kísérleteink következő csoportjával megvizsgáltuk a PHYB különböző hosszúságú szakaszainak működését a pulzus-szerű beállítás folyamatában. A kísérletekhez a *CCR2:LUC+* markert hordozó, különböző genetikai háttérű növényeket használtuk. A növényeket 7 napig neveltük normális fény/sötét ciklusokon, majd folyamatos sötétbe helyeztük őket és követtük a

lumineszcencia változásait. ZT41 időpontban (első szubjektív éjszaka első fele, lásd az Irodalmi Áttekintés-t) a növények felét erős vörös fény-pulzussal kezeltük, majd folytattuk a lumineszcencia mérést. A mérés végeztével határoztuk meg a fázis eltolódásokat, a besugárzott és nem besugárzott, kontroll növényekben mért *CCR2:LUC+* ritmusok fázisának összehasonlításával. Az **5.8. ábra** mutatja, hogy a vad típusú növényeknél 6 órás fáziskésés volt tapasztalható, míg a *phyB-9* növényeknél a válasz mértéke jelentősen csökkent, de nem szűnt meg teljesen. Hasonlóan a periódushossz fenotípus komplementációjánál tapasztaltakhoz, a BFL és a B651-NLS képes volt kiváltani a vad típusú választ, de a B410-NLS nem működött.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a PHYB N-terminális szakaszai nem csak az óra periódushosszát szabályozó folyamatos fény hatását tudják közvetíteni, hanem a rövid fény impulzusok hatását is az óra fázisának beállítására.



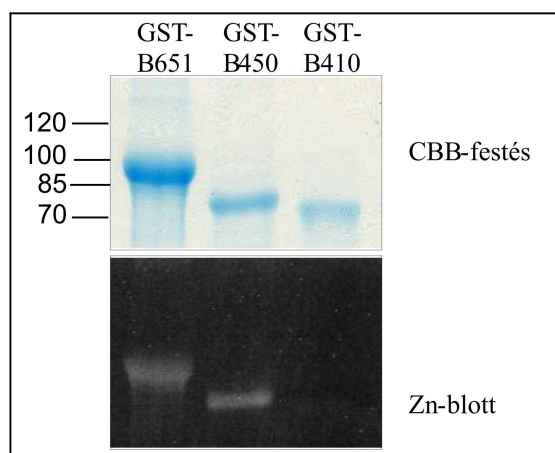
**5.8. ábra. A 651 aminosavat tartalmazó PHYB N-terminális szakasz elegendő a vörös fényimpulzusok által indukált óra beállításhoz.**

A *CCR2:LUC+* markert kifejező Col-0, *phyB-9*, BFL, B651-NLS és B410-NLS növényeket 12 óra fehér fény/12 óra sötét cikluson neveltük 7 napig, majd az utolsó fény-sötét átmenetnél sötétbe helyeztük azokat. A *CCR2:LUC+* lumineszcenciát óránként mértük. Állandó sötétben, 29 óra múlva (ZT41) a növények felét 1 órás  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású vörös fénybesugárzással kezeltük, majd folytattuk a mérést sötétben. A fényindukált fázisváltozásokat a kezelt, ill. a nem kezelt növényekben mért *CCR2:LUC+* ritmusok fázisának összevetésével határoztuk meg. A fáziskéséseket cirkadián időben (CT) kifejezve ábrázoltuk. A hibasávok az átlag szórását mutatják (SE).

## 5.6. A B410-NLS fúziós fehérje a PHYB receptor kromofór kötésére képtelen, inaktív változata

A fitokróm fotoreceptorok működésének alapvető feltétele a kromofór csoport kapcsolódása a fitokróm apoproteinhez. A fény elnyeléséért a kromofór felelős és a kromofór fényindukált izomerizációját követi az apoprotein konformáció-változása. Ennek során alakul az aktív Pfr forma, amely a fitokrómok által indukált válaszokért felelős.

Mivel a B410-NLS forma egyetlen általunk végzett kísérletben sem mutatott még részleges funkciót sem, felmerült annak a lehetősége, hogy a legrövidebb csonka PHYB verzió nem képes a kromofór kötésére. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk mindhárom általunk készített PHYB verzió kromofórkötő képességét az ún. cink-blott módszerrel. A fehérjéket baktériumban termeltettük, izoláltuk és tisztított kromofórral inkubáltuk, melynek során a fitokróm apoproteinek képesek kovalensen magukhoz kapcsolni a kromofór molekulákat. Ezt követően gélen elválasztottuk a fehérjéket, majd blottolás után a filtert cink-acetát oldattal kezeltük és UV-fény alatt értékeltük. Az **5.9 ábra** mutatja, hogy a 651 és 450 aminosavat tartalmazó formák képesek a kromofór kötésére, amit a kromofór által Zn jelenlétében kibocsátott fluoreszcencia bizonyít. Ezzel szemben a 410 aminosavat tartalmazó verzió nem mutatott értékelhető kötést.



**5.9. ábra A 410 aminosavat tartalmazó N-terminális PHYB változat nem képes kromofór kötésére**  
A különböző csonka PHYB formákat baktériumban termeltettük GST-fúziós fehérék formájában. A tisztított fehérjéket kromofórral inkubáltuk, SDS-poliakrilamid gélen választottuk el, majd Coomassie Brilliant Blue (CBB) festéssel ellenőriztük integritásukat. Blottolás után UV fény alatt detektáltuk a kromofór csoport Zn<sup>++</sup> ionok jelenlétében megfigyelhető fluoreszcenciáját (Zn-blott).

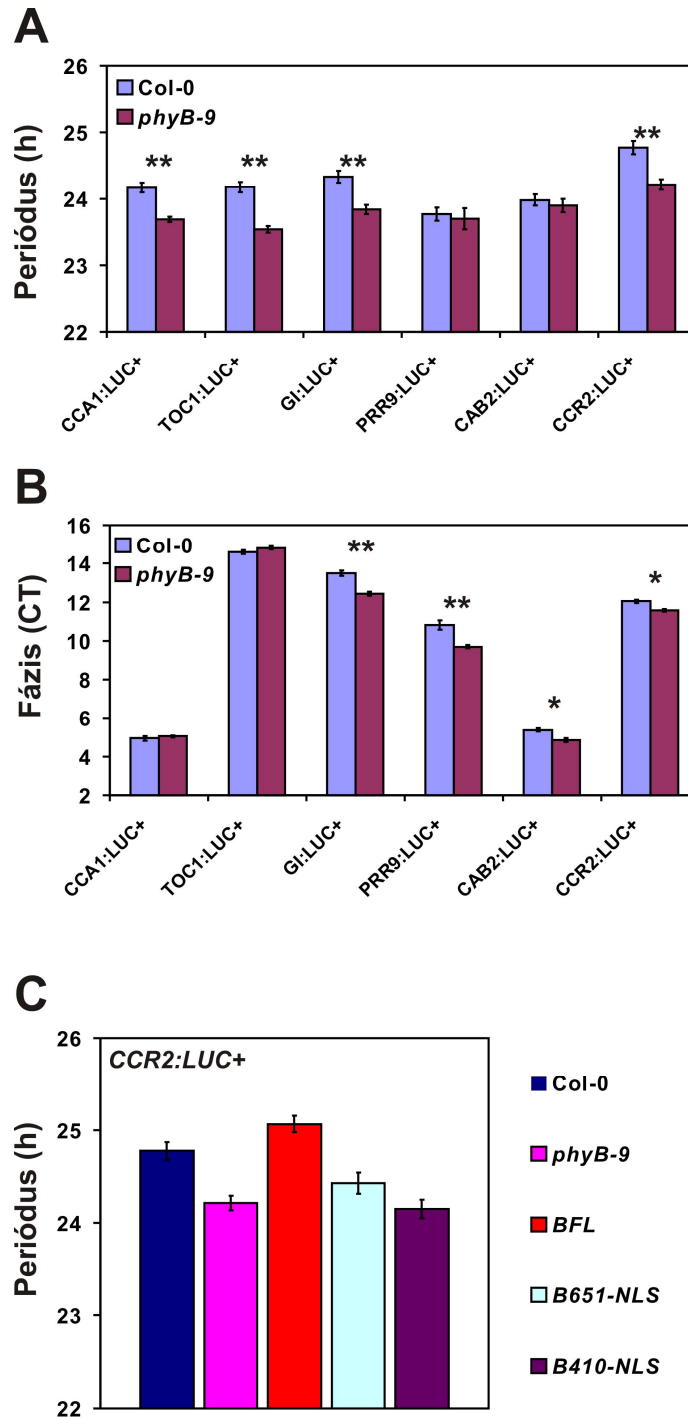
## 5.7. A PHYB hatása az órára folyamatos fehér fényben

Bár a PHYB kizárólag vörös fény elnyelésére képes receptor, a *phyb* mutánsok fotomorfogenikus fenotípusa (hosszú hipokotil) fehér fényben is nyilvánvaló. Ezért keltettek érdeklődést azok a kísérletek, amelyek tanúsága szerint *phyb* mutánsokban a *CAB2:LUC* markergén ritmikus kifejeződése nem mutat periódushossz-változást folyamatos fehér fényben. Ez arra utalna ugyanis, hogy a fenti fényviszonyok (vagyis a természeteshez közeli) mellett a PHYB nem továbbít jeleket az óra felé. Ezt tisztázandó, az elérhető LUC markerek segítségével megvizsgáltuk az óragének, ill. kimeneti gének ritmikus kifejeződését vad típusú és *phyB-9* mutáns növényekben folyamatos fehér fényben. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy a *PRR9* kivételével, az összes óragén kifejeződése rövid periódust mutatott a *phyB-9* mutáns növények esetében (**5.10.A ábra**). A *CCA1:LUC+* és a *TOC1:LUC+* kifejeződésének fázisa nem változott, de a *GI:LUC+* és a *PRR9:LUC+* kifejeződése fáziscsúszást mutatott a *phyB-9* növényeknél (**5.10.B ábra**). A *CAB2:LUC+* kifejeződése nem mutatott periódusváltozást az általunk használt *phyB-9* háttérű növények esetén. Ellenben, egy másik cirkadián kimeneti marker, a *CCR2:LUC+* kifejeződése jelentős periódus rövidülést mutatott a mutáns háttérű növényeinknél.

Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a PHYB működésében történt mutációk különbözőképpen hatnak a cirkadián oszcillátorra folyamatos fehér és vörös fény esetén, amely egy összetett kölcsönhatást feltételez az óra felé vezető, vörös és kék fény jelátviteli útvonalak között.

A komplementációs tesztet erre az egyedi cirkadián fenotípusra nézve is elvégeztük. Az **5.10.C ábra** mutatja, hogy csak a teljes hosszúságú PHYB volt képes a helyreállítani a *CCR2:LUC+* vad típusú periódusát. Megállapíthatjuk tehát, hogy a vörös fénnel ellentétben, a fehér fény esetében a PHYB C-terminális doménje is szükséges és nélkülözhetetlen az óra megfelelő beállításához.





**5.10. ábra. A *phyB-9* növények cirkadián fenotípusa folyamatos fehér fényben.** A transzgenikus növények 12 óra fehér fény/12 óra sötét körülmények között nevelkedtek 7 napig, majd  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású folyamatos fehér fénybe helyeztük őket.

**A,** *CCA1:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+*, *PRR9:LUC+*, *CAB:LUC+* vagy *CCR2:LUC+* markergének periódushosszai Col-0 (fekete oszlopok) vagy *phyB-9* (fehér oszlopok) háttérben.

**B,** *CCA1:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+*, *PRR9:LUC+*, *CAB:LUC+* és a *CCR2:LUC+* markergének kifejeződésének fázisai Col-0 (fekete oszlopok) vagy *phyB-9* (fehér oszlopok) háttérben.

**C,** A *CCR2:LUC+* periódushossza Col-0, a *phyB-9*, a BFL, a B651-NLS, és a B410-NLS növényekben. A hibasávok az átlag szórását mutatják (SE). A Col-0 és a *phyB-9* közötti statisztikailag jelentős különbséget csillaggal jelöltük. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ .

## 6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A PHYB a fényen nőtt *Arabidopsis* növények legfontosabb vörös/távoli vörös fényt elnyelő fotoreceptora. Számos kísérlet bizonyítja, hogy a PHYB jeleket továbbít a fotomorfogenezis és a virágzás szabályozásához, továbbá a cirkadián óra beállításához. Ennek következtében a *phyB* mutánsokra a hosszú hipokotil, a korai virágzás és a hosszú periódusú cirkadián ritmus jellemző, speciális fénykörülmények mellett (Reed és mtsai, 1993; Somers és mtsai, 1998; Endo és mtsai, 2005).

A PHYB receptor két fő doménből áll: a kromofórkötő fényérzékelő N-terminális doménből, és a hisztidin kináz-szerű aldoment és a dimerizációért ill. a sejtmagi importért felelős fehérje motívumokat tartalmazó C-terminális doménből. Ismeretes, hogy a PHYB N-terminális doménjének dimerjei – amennyiben idegen NLS motívum hozzákapcsolásával biztosították a sejtmagba jutásukat - a teljes PHYB funkciójával rendelkeznek mind a fotomorfogenezis, mind a virágzási idő szabályozására vonatkozóan (Matsushita és mtsai, 2003). Más szóval, a hisztidin kináz domén nélkülözhető a PHYB ezen funkcióihoz, és a C-terminális rész fő feladata, hogy lehetőséget nyújt a dimerizációra és ellenőrzi a fehérje belépését a sejtmagba.

Kísérleteink egyik célja annak megállapítása volt, hogy mennyiben járul hozzá az N-terminális domén a PHYB cirkadián funkciójához, vagyis a vörös fényjeleknek a cirkadián oszcillátorhoz való közvetítéséhez. Ennek érdekében génkonstrukciókat készítettünk, amelyek a PHYB N-terminális 651 aminosavat tartalmazó doménjét, a hozzá kapcsolt YFP riporter-fehérjét, dimerizációs motívumokat és NLS vagy NES elemeket tartalmazó fúziós fehérjéket (B651-NLS vagy B651-NES) kódoltak. A génkonstrukciókat a CaMV 35S promoterének irányítása alatt fejeztettük ki a *phyB-9* funkcióvesztéses mutáns háttérben (Reed és mtsai, 1993). Kimutattuk, hogy a fúziós fehérjék az YFP-hez kapcsolt teljes hosszúságú PHYB (BFL) fehérjékhez hasonló szinten fejeződtek ki az analízisre kiválasztott vonalakban (**5.1.B ábra**). A BFL fehérjét szintén a *phyB-9* mutánsban fejeztettük ki, és kontrollként használtuk kísérleteink során. A fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedését az YFP-fluoreszcencia segítségével követtük (**5.2. ábra**, **5.3. ábra**). A fenti vizsgálatok révén egyrészt ellenőriztük, hogy a viszonylag bonyolult, sok tagból felépülő fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedése a várt mintázatot mutatja, másrészt biztosítottuk, hogy a további részletes analízisre olyan transzgenikus vonalakat válasszunk ki, amelyek megfelelő szinten termelik az N-terminális PHYB fragmentumokat.

A fény bemeneti jelátviteli út két módon járulhat hozzá a cirkadián oszcillátor beállításához a megvilágítás időtartamától függően. Állandó megvilágítás mellett, a szabadonfutó periódushossz rövidül a fényintenzitás növelésével (parametrikus beállítás). Állandó sötétben, rövid fénypulzusok alkalmazása fáziskésést vagy fáziscsúszást idéz elő az oszcillátorban, ezáltal a cirkadián ritmusokban is (nem-parametrikus beállítás; Devlin és Kay, 2001). A PHYB fotoreceptor által közvetített vörös fényjelek mindkét típusú beállításban fontos szerepet játszanak (Somers és mtsai, 1998; Yanovsky és mtsai, 2001). Az **5.5.** és az **5.6. ábra** a központi oszcillátor génjeinek hosszú periódusú ritmikus kifejeződését mutatja *phyB-9* növényekben a vad típusú növényekhez képest,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  intenzitású folyamatos vörös fényben (a parametrikus beállítás zavara). Az **5.8. ábra** mutatja, hogy a PHYB funkció hiányában csökken az oszcillátor vörös fénypulzusok által kiváltott fázisválasza (a nem-parametrikus beállítás zavara).

Eredményeink megmutatták, hogy a B651-NLS, a teljes hosszúságú PHYB-hez (BFL) hasonlóan, hatékonyan helyreállította a *phyB-9* hiánymutánsok ezen fenotípusait. Érdekes, hogy a BFL (és a B651-NLS) növényekben a *CCA1* mRNS ritmikus kifejeződésének amplitúdója jelentős növekedést mutatott, de periódusa nem lett rövidebb. Leírták, hogy a PHYB túltermelése a *CAB:LUC* kifejeződés periódusának rövidülését eredményezi folyamatos vörös fényben (Somers és mtsai, 1998; Hall és mtsai, 2002), és korán virágzik rövid- és hosszúnappalon egyaránt (Bagnall és mtsai., 1995). A BFL cirkadián és virágzási idő fenotípusának hiánya valószínűleg annak köszönhető, hogy a kiválasztott BFL vonalakban a PHYB fehérjeszint hasonló lehet a vad típusú növényekben mérhető szintekhez. Ezzel szemben, a korábbi kísérletek során használt PHYB-túltermelő vonalak a vad típusnál mintegy 15-ször magasabb PHYB fehérjeszinttel rendelkeztek. A BFL és a B651-NLS növényekkel szemben, a B651-NES képtelen volt a *CCA1* ill. *TOC1* ritmikus kifejeződésének PHYB általi szabályozását visszaállítani (**5.6.C és H ábra**).

Ezek az eredmények bizonyítják, hogy a PHYB N-terminális doménje minden olyan funkcióval rendelkezik, amely a vörös fény elnyeléséhez, majd jeleknek a cirkadián órához való közvetítéséhez szükségesek. Igazoltuk azt is, hogy a PHYB cirkadián funkciója, a fotomorfogenezist és a virágzási időt szabályozó funkciójához hasonlóan, megköveteli a PHYB sejtmagi elhelyezkedését.

A sejtmagban elhelyezkedő PHYB által közvetített beállítás molekuláris mechanizmusa még nem tisztázott, de a legvalószínűbb, hogy a PHYB olyan szabályozó fehérjével lép kapcsolatba, amelyek közvetlenül vagy közvetve hatással vannak az oszcillátor működésére. Az órára ható proteinek közül, a ZEITLUPE (ZTL) és az EARLY

FLOWERING3 (ELF3) mutatott kölcsönhatást a PHYB fehérjével élesztőben vagy *in vitro* kísérletekben (Jarillo és mtsai, 2001; Liu és mtsai, 2001). A ZTL egy ún. F-box protein, amely szerepet játszik a TOC1 fehérjék ubiquitinációjában, így elősegíti azok lebontását (Mas és mtsai, 2003). Mivel a TOC1 a központi oszcillátor egyik komponense, mennyiségének befolyásolásán keresztül a ZTL jelentős hatással van a szabadonfutó periódushosszra (Somers és mtsai, 2000; Kevei és mtsai, 2006). Az ELF3 egy óra által szabályozott sejtmagi fehérje, amely negatívan szabályozza a fényfüggő beállítást (Covington és mtsai, 2001). Kimutatták ugyanakkor, hogy a ZTL és az ELF3 is a PHYB C-terminális doménjéhez kötődik, amely adataink szerint nem szükséges a vörös fényel történő beállításhoz. Ez azt jelenti, hogy a PHYB a vörös fényjeleket nem a ZTL vagy az ELF3 fehérjéken keresztül továbbítja az oszcillátorhoz.

Valójában a PIF3 transzkripció faktor az egyedüli olyan fehérje, amely igazoltan fizikailag kapcsolódik a PHYB N-terminális részéhez (Shimizu-Sato és mtsai, 2002). A PIF3 a PHYB mellett kölcsönhatást mutatott a TOC1 fehérjével is (Yamashino és mtsai, 2003). Mivel a PIF3 potenciálisan kötődik a *CCA1* és *LHY* gének promóterében található G-box elemhez, általánosan elfogadottá vált az a hipotézis, mely szerint a PHYB-PIF3-TOC1 fehérje-komplex közvetlen módon továbbítja a fényjeleket az egyes központi óragének transzkripciójának szabályozáshoz (Martinez-Garcia és mtsai, 2000). Ezen túlmenően bebizonyították, hogy a PIF3 faktorra rokon szerkezetű és funkciójú PIF1, PIF4 és a PIF5 is képesek kölcsönhatásba lépni a TOC1 fehérjével (Yamashino és mtsai, 2003), ami tovább erősítette a fent vázolt elképzelést. A további vizsgálatok azonban kiderítették, hogy a PIF fehérjék mutációja vagy túltermeltetése nincs hatással a növényi cirkadián óra beállítására (Fujimori és mtsai, 2004; Viczián és mtsai, 2005). Ez azt jelenti, hogy a PIF transzkripció faktorok valószínűleg nem a végső elemei a PHYB által az órához közvetített vörös fény bemeneti oldalának. Újabb adatok szerint a PIF fehérjék inkább az óra által szabályozott folyamatok fényregulációjában játszanak fontos szerepet (pl. ritmikus hipokotil megnyúlás, Nozue és mtsai, 2007). Összegezve az eddigieket: annak felfedezése, hogy a PHYB közvetítette fényjel milyen molekuláris eseményeken keresztül vezet a cirkadián oszcilláció sebességének, vagy fázisának megváltoztatásához, még várat magára.

Oka és munkatársai 2004-ben közölték, hogy a PHYB N-terminális doménjének az első 450 aminosavat tartalmazó rövid darabja közvetíti a fotomorfogenikus válaszreakciókat, amennyiben egy idegen NLS motívum hozzákapcsolásával a csonka receptort a sejtmagba irányították. Elkészítettük a fenti PHYB verzióknak megfelelő génkonstrukciót, amely a

PHYB fragmentum mellett dimerizációs és NLS motívumokat is tartalmazott. A konstrukciót - a korábbiakhoz hasonlóan - *phyB-9* mutánsokban fejeztettük ki (B450-NLS). Ezeknek a transzgenikus vonalaknak az analízise megerősítette, hogy a PHYB e rövid N-terminális szakasza elegendő a hipokotil megnyúlás gátlásához (**5.4.A ábra**), és rávilágított arra, hogy ez a szakasz képes a periódushossz szabályozását végző vörös fényjelek továbbítására is. Az **5.6.D és I ábrák** szemléltetik, hogy a B450-NLS helyreállítja a *CCA1* és *TOC1* vad típusú expressziós mintázatát. Eredményeinkből az is következik, hogy a PHY al-domén, amelyet a B651-NLS még tartalmaz, de a B450-NLS fehérjéből már hiányzik, nem szükséges a PHYB beállító funkciójához. A fotomorfogenezistől és a cirkadián fenotípustól eltérően, a *phyB-9* korai virágzás fenotípusát nem hozta helyre a B450-NLS. Az **5.4.B ábra** mutatja, hogy a hosszúnappalon (16 óra fény/8 óra sötét) növekedett B450-NLS növények ugyanakkor virágoztak, mint a *phyB-9* mutánsok. Ez a megfigyelés rámutat arra, hogy a PHY al-domén kötőhelyet szolgáltathat egy, még ismeretlen faktornak, ami azt a jelet továbbítja, amely a CO fehérje destabilizációjához és végső soron a virágzás késleltetéséhez vezet. Azok a megfigyelések, melyek szerint a PHYB hatással van a CO fehérje szintekre, és a *phyB* mutáns növények korai virágzás fenotípusa független a nappalhosszúságtól, már korábban is jelezték, hogy a *phyB* mutánsok korai virágzása nem a módosult óraműködésből következménye. Eredményeink alátámasztják ezt következtetést, mivel a B450-NLS növények vad típusú cirkadián ritmusokat hoznak létre, habár a *phyB-9* mutáns növényekre jellemző korai virágzás fenotípust mutatják.

Céljaink között szerepelt az is, hogy meghatározzuk azt a minimális PHYB szakaszt, amelyik még működőképes a sejtmagban, ezért olyan transzgenikus növényeket is előállítottunk, amelyekben a PHYB 410 aminosavat tartalmazó csonkolt darabja (B410-NLS) volt kifejeztetve. Annak ellenére, hogy ez a verzió csak 40 aminosavval rövidebb a B450-NLS változatnál és a B651-NLS fehérjéhez hasonló szinten fejeződött ki, a B410-NLS még csak részlegesen sem állította helyre a *phyB-9* mutánsokra jellemző fenotípusok egyikét sem. Meg kell jegyeznünk, hogy a B651-NLS és a B450-NLS verziók hatása szigorúan fényfüggő volt, sötétben is működő jelátviteli mechanizmusnak nem volt nyoma (Matsushita és mtsai, 2003; Oka és mtsai., 2004). Ez azt jelenti, hogy pusztán a PHYB fragmentumok sejtmagba juttatása még nem indítja be a fényfüggő jelátviteli utakat; ennek előfeltétele a PHYB fényindukált konformációváltozása. A fényindukált  $P_r \rightarrow P_{fr}$  fotokonverziós átalakuláshoz a kromofórnak csoportnak a PHYB apoproteinhez kell kapcsolódnia. A kromofór kapcsolódása enzimatikus folyamat, amelyet a fitokrómok N-

terminális részén található bilin-liáz al-domén katalizál. A folyamat fitokróm apoprotein is kromofór jelenlétében *in vitro* is működik. Ezt használja ki az ún. „Zinc blot” módszer, amelyet a különböző PHYB változatok kromofórkötő képességének, vagyis a bilin-liáz al-domén funkciójának ellenőrzéséhez használtunk (Oka és mtsai, 2004). Az **5.9. ábra** szemlélteti, hogy a B651 és a B450 képes volt autoligálni, vagyis megkötni a kromofórt. Ellenben a B410 változat esetében nem tapasztaltunk kromofór kötést, ami arra utal, hogy a B410-es deléción elrontotta a bilin-liáz domén működését.

Az óragének kifejeződésének kvantitatív analízise a *phyB-9* mutáns háttérben előre nem várt összefüggésekre mutatott rá a cirkadián oszcillátorhoz vezető fény-bemenet jelátviteli rendszerének működésében. A növényi cirkadián oszcillátor három, transzkripción/transzláción alapuló, negatív visszacsatolással szabályozott regulációs kört tartalmaz. A „reggeli” kör a *CCA1/LHY* és a *PRR7/9* gének/fehérjék kapcsolatán keresztül működik, az „esti” kör a *TOC1* és az *Y/GI* közti szabályozáson alapul, és e két kör össze van kapcsolva egy harmadik, központi kör révén, amelyet a *CCA1/LHY*, *TOC1* gének és egy még ismeretlen X faktor épít fel. Vad típusú növényekben, szabadonfutó körülmények mellett, ezek a szabályozó körök fogaskerekekhez hasonlóan egymáshoz kapcsolódnak, ezért az említett gének ritmikus kifejeződése is kapcsolt egymáshoz. A növényi cirkadián óra matematikai modellje szerint elméletileg elképzelhetőek olyan speciális körülmények, mikor a reggeli és az esti körök nem tudnak tökéletesen kapcsolódni, ezért a két kört alkotó óragének szabadonfutó periódusa eltérhet. Ilyen speciális körülmény lehet például az X faktor funkciójának gátlása. Az **5.4. ábra** adatai szemléltetik, hogy a PHYB hiánya különbözőképpen befolyásolja a reggeli és az esti körök oszcillációjának sebességét folyamatos vörös fényben. A *CCA1* és a *PRR9* (reggeli gének) kifejeződése szignifikáns hosszú periódusú ritmust mutatott *phyB-9* növényekben a teljes vizsgált intenzitás-tartományban, míg a *TOC1* és a *GI* kifejeződésénél kisebb eltérést tapasztaltunk a periódushossz változásában. Fontos megemlíteni, hogy alacsonyabb, vagy magasabb intenzitású vörös fényben a *phyB-9* mutáció gyakorlatilag egyáltalán nem volt hatással az esti kör ritmusára, míg a reggeli kör oszcillációja ugyanezen körülmények mellett jelentősen lassult (hosszabb periódus). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PHYB receptor hiányában az adott körülmények gyengítették a kapcsolatot a reggeli és az esti kör között. Fontos ismételt hangsúlyoznunk, hogy az egyes gének kifejeződésének periódushosszát promóter:luciferáz markerek segítségével határoztuk meg transzgenikus növényekben. A konstrukciókat elsődlegesen vad típusú növényekbe transzformáltuk, majd az egyes kiválasztott vonalakból keresztezéssel juttattuk *phyB-9* háttérbe. Ez azt jelenti, hogy egy

adott konstrukciót (pl. *CCA1:LUC+*), vad típusú és *phyB-9* háttérben is ugyanaz a transzgén képvisel. Ez azért fontos, mert a transzgén genomba épülésének helye jelentős hatással lehet a transzgén kifejeződésének szintjére és mintázatára is. Mivel ebben a tekintetben nincs különbség a vad típusú és a mutáns háttérben található markergén között, a két háttér között mérhető különbség csakis a PHYB hiányának köszönhető.

Ezzel szemben, a különböző markergének (pl. *CCA1:LUC+* és *PRR9:LUC+*) természetesen különböző, független transzformációs esemény során épültek a genomba, ezért az inszerciók genomi környezete eltérő, ami eltérő módon hat a transzgének kifejeződésére. Így előfordulhat, hogy pl. a *CCA1:LUC+* és *PRR9:LUC+* látszólag eltérő periódust mutat akár vad típusú háttérben is. Annak eldöntésére, hogy ez a különbség valós vagy csupán technikai hiba, nagyszámú független transzgenikus vonal átvizsgálása szükséges, amit egyelőre még nem állt módunkban elvégezni.

Más szavakkal kifejezve: egy adott marker kifejeződését összehasonlíthatjuk vad típusú és *phyB-9* növényekben, de a különböző markerek periódusát nem hasonlíthatjuk egymáshoz korrekt módon.

Habár a PHYB szerepe továbbra sem világos a látszólagos szétkapcsolódásban, eredményeink rávilágítottak a növényi cirkadián oszcillátorhoz vezető fénybemeneti oldal molekuláris mechanizmusainak bonyolult összefüggéseire. Ezt a komplexitást fokozták a *phyB-9* mutáns növényeken folyamatos fehér fényben végzett vizsgálatok eredményei (**5.6. ábra**). Adatainkból kiderül, hogy a PHYB ellentétes hatással van az óra működésére vörös, ill. fehér fényben, mivel a *phyB-9* mutánsokban a szabadonfutó periódus vörös fényben hosszabb, míg fehér fényben rövidebb, mint a megfelelő vad típusú növényekben. A fehér fény forrásaként hideg-fehér fluoreszcens csöveket használtunk, amelyek kékben gazdag fényt bocsátanak ki. Más kutatócsoportok viszont beszámoltak arról, hogy a PHYB hiánya nincs hatással a periódushosszra monokromatikus kék fényben (Devlin és Kay, 2000). Ezért fontos kiemelni, hogy az alkalmazott fehér fény semmiképpen sem tekinthető monokromatikus kék fénynek: a *phyB-9* növények hosszú hipokotilt mutattak az alkalmazott fehér fényben, ami bizonyítja, hogy az jelentős, a PHYB aktivációjához elegendő vörös komponenst is hordozott. Mindezek alapján úgy véljük, hogy a *phyB-9* mutánsok rövid periódusú fenotípusa az órát szabályozó vörös és kék fény jelátviteli utak szimultán aktivációja során jelenik csak meg és a vörös fénnel aktivált PHYB kék jelátvitelre gyakorolt negatív hatásával magyarázható. Ezt a hipotézist erősíti az a tény is, hogy az ötszörös *phy* mutáns növényekben a levélmozgás ritmusa nagyon jelentős rövid periódus fenotípust mutat folyamatos fehér fényben (Strasser és mtsai, 2010), ami arra utal,

hogy az óra kék fény bemeneti oldala a fitokrómok aktivációja által gyengül. A fitokrómok hiányában ez a gátlás megszűnik, a kék jelátvitel jelentősen erősödik az óra irányába, ami az Aschoff-szabálynak megfelelően rövid periódust okoz. Mivel a PHYB receptornak pozitív hatása van a CRY2 jelátvitelében (Mas és mtsai, 2000), a kék fény bemeneti oldalnak egy másik útja lehet érintett. Az oszcillátorhoz tartó vörös és kék jelátviteli utak kölcsönhatása ugyan még tisztázásra vár, de igazoltuk, hogy a PHYB fontos, egyfajta integráló szerepet játszik ebben. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy a BFL képes helyreállítani a *phyB-9* rövid periódusát fehér fényben, de a B651-NLS nem (**5.10.C ábra**). Mivel BFL és a B651-NLS fehérjék kifejeződése hasonló szintet mutatott (**5.1.B ábra**), a B651-NLS komplementációjának hiánya a PHYB C-terminális doménjének hiányából adódhat. Ez azt jelenti, hogy folyamatos fehér fényben a vörös és a kék fénybemenet megfelelő kölcsönhatásához a PHYB C-terminális szakasza is szükséges.



## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban bemutatott munka fő célja a fitokróm B (PHYB) fotoreceptor cirkadián óra beállításában betöltött szerepének mélyebb megértése volt. A kérdéskört két irányból közelítettük meg. Egyrészt megvizsgáltuk, hogy a PHYB hiánya (a *phyB-9* mutánsban) milyen hatással van az órára, azon belül az órát felépítő szabályozó körök működésére és az egyes óragének ritmikus kifejeződésére különböző fényviszonyok mellett. Másrészt különböző N-terminális csonkolt PHYB fragmentumokat fejeztünk ki a *phyB-9* háttérben, amelyek segítségével kiderítettük, hogy a PHYB receptor mely doménjei hordozzák azt a funkciót, amely szükséges az elnyelt fényjelek továbbításához az óra irányába. A PHYB deléciós sorozat vizsgálata ezen túlmenően fontos új információkat szolgáltatott a receptor fotomorfogenezist és virágzási időt szabályozó szerepéről is. Fontosabb eredményeinket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

Konstrukciókat készítettünk az óragének promótereinek és a luciferáz (LUC+) riporter gén felhasználásával. A konstrukciókat (*CCA1:LUC+*, *TOC1:LUC+*, *GI:LUC+*, *PRR9:LUC+*) vad típusú (Col-0) és *phyB-9* növényekbe juttattuk, majd a transzgenikus növényeket különböző intenzitású folyamatos vörös fényben tartva vizsgáltuk meg ezek kifejeződésének szabadonfutó periódushosszát és cirkadián fázisát. Az óragének általában hosszú periódust mutattak a vizsgált fényintenzitásoknál a *phyB-9* növényekben a vad típusú kontrolhoz képest, de az eredmények precíz elemzése után egyértelművé vált, hogy valójában két csoportra oszthatjuk ezeket a géneket. A *CCA1:LUC+* és a *PRR9:LUC+* valamennyi vizsgált fényintenzitásnál hosszabb periódust (kb. 1 óra különbséget) mutatott a *phyB-9* növények esetében a Col-0 növényekhez viszonyítva. Ellenben, a *TOC1:LUC+* és a *GI:LUC+* esetében kisebb, de szignifikáns különbség (kb. 0.5 óra) mutatkozott a periódushossz változásnál a mutáns és vad típusú növényeket összehasonlítva közepes fényintenzitások mellett. Meglepő módon, ez a két marker a mutáns háttérben nem mutatott jelentős periódusváltozást alacsony vagy magas intenzitású vörös fényben. A *CCA1* és *PRR9* gének az ún. reggeli, míg a *GI* és *TOC1* az ún. esti szabályozó kör komponensei. Adataink alapján a *phyB-9* mutánsban bizonyos fényviszonyok mellett a reggeli és az esti szabályozó kör oszcillációja (amit a köröket alkotó gének kifejeződésének periódushosszával jellemezhetünk) eltérő sebességet mutat. Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a PHYB különböző minőségű és/vagy erősségű bemeneti jelet továbbít a növényi cirkadián óra központi oszcillátorának reggeli (*CCA1*, *PRR9*) ill.

esti (*TOC1*, *GI*) szabályozó köreihez az alkalmazott fényintenzitásoktól függően, amelyek végső soron a két szabályozó kör szétkapcsolódásához vezethetnek.

A fentiekben említett transzgenikus növények folyamatos fehér fényben történő vizsgálata szintén meglepő eredményeket adott. Fehér fényben a PHYB receptor a vörös komponens elnyelésében vesz részt és az ebből származó jeleket továbbítja az órához. PHYB hiányában ezek a jelek nem jutnak el az oszcillátorhoz, ezért a vörös fényben kapott eredményekhez hasonlóan azt vártuk, hogy a *phyB-9* növények hosszabb periódust mutatnak a vad típusú kontrollhoz képest. Ezzel szemben a vizsgált gének (pontosabban promoter:LUC+ konstrukciók) többsége egyértelmű rövid periódust mutatott. Az általunk használt fehér fény a vörös mellett jelentős kék komponenst is tartalmazott, viszont ismert, hogy a PHYB nem képes a kék fény elnyelésére. Ezért eredményeink legvalószínűbb magyarázata az, hogy a vörös fénnel aktivált PHYB negatív hatással van az órát szabályozó kék fény jelátvitelre. A vörös és kék jelátviteli utak kölcsönhatására már korábbi eredmények is utaltak, de elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a PHYB fontos szerepet játszik ebben.

A komplementációs kísérletekhez olyan génkonstrukciókat készítettünk, amelyek a PHYB N-terminális szakaszának 651, 450 vagy 410 aminosav hosszúságú szakaszát, idegen dimerizációs és NLS vagy NES fehérjemotívumokat, valamint az YFP riporterfehérjét kódolták (B651-NLS, B450-NLS és B410-NLS, ill. B651-NES). A BFL konstrukció, amelyet kontrollként alkalmaztunk, a teljes hosszúságú PHYB fehérjét és az YFP proteint kódolta. A fúziós fehérjéket *phyB-9* háttérben fejeztettük ki a magas szintű és konstitutív expressziót biztosító CaMV 35S promoter irányítása alatt. Az elkészült transzgenikus vonalakban meghatároztuk a fúziós fehérjék kifejeződésének szintjét és a további vizsgálatokhoz olyan vonalakat válogattunk, amelyekben a transzgének kifejeződése hasonló szintű volt. Fluoreszcens mikroszkópiával ellenőriztük a termeltetett fúziós fehérjék sejten belüli elhelyezkedését. Igazoltuk, hogy az NLS motívumot hordozó fehérjék a fényviszonyoktól függetlenül a sejtmagban, míg a NES-kapcsolt változat a citoplazmában fordul elő. A BFL fehérje az elvárt fényfüggő sejtmagi importot mutatta. Mindezek az adatok azt bizonyítják, hogy a további vizsgálatokat megfelelően elkészített transzgenikus növényi anyagon végeztük el.

Első lépésben megvizsgáltuk az oszcillátor működését a komplementáló vonalakban közepes intenzitású vörös fényben. Ennek érdekében a *CCA1* és a *TOC1* gének kifejeződésének ritmusát vizsgáltuk mRNS szinten vad típusú, *phyB-9* és különböző komplementáló vonalakban. Kimutattuk, hogy a BFL, B651-NLS és B450-

NLS változatok helyreállították a vad típusnak megfelelő periódust, míg a B651-NES és B410-NLS növények a *phyB-9* mutánsokra jellemző hosszú periódust mutatták. Eredményeink arra utalnak, hogy a PHYB receptor N-terminális 450 aminosavat tartalmazó szakasza minden olyan funkciót hordoz, amely a vörös fényjelek továbbításához szükséges. Másrészt bizonyítottuk, hogy a PHYB cirkadián funkciója a receptor sejtmagi lokalizációját igényli.

Kimutattuk viszont, hogy egyik csonka PHYB verzió sem képes a *phyB-9* rövid periódusú fenotípusának helyreállítására folyamatos fehér fényben. Mivel a teljes hosszúságú BFL sikeresen komplementálta ezt a fenotípust, adataink arra utalnak, hogy a PHYB C-terminális szakasza szükséges ahhoz, hogy a vörös fénnel aktivált PHYB receptor hatással legyen az órát szabályozó kék fény jelátvitelre.

A *phyB-9* mutáns növények jellegzetes fenotípusokat mutatnak a fotomorfogenezis (hosszú hipokotil) és a virágzás (korai virágzás) szabályozását illetően is. Megvizsgáltuk, hogy az általunk készített csonka N-terminális PHYB verziók képesek-e helyreállítani ezeket a fenotípusokat. Kimutattuk, hogy a PHYB N-terminális 450 aminosavat tartalmazó szakasza elegendő ahhoz, hogy a receptor közvetítse a vörös fény gátló hatását a hipokotil megnyúlás tekintetében. Ezzel szemben a B450-NLS nem komplementálta a *phyB-9* mutánsok korai virágzását, míg a B651-NLS hatásos volt ebben a vonatkozásban. Ez arra utal, hogy a PHYB receptor 450. és 651. aminosav pozíciók közötti szakasza elengedhetetlen a virágzás szabályozásában. Mivel a B651-NES verzió nem mutatott hatást a vizsgált fenotípusokat illetően, megállapítottuk, hogy a cirkadián óra szabályozásához hasonlóan a PHYB fotomorfogenezisben és a virágzás szabályozásában betöltött szerepe is a receptor sejtmagi lokalizációját igényli.

A B651-NES verzióhoz hasonlóan a B410-NLS is funkcionálisan inaktív volt valamennyi vizsgáltunk során. Igazoltuk, hogy míg a B651-NES inaktivitásának oka a fehérje kizárása a sejtmagból, addig a B410-NLS esetében a kromofór csoport nem kapcsolódik a csonka PHYB apoproteinhez, így az nem képes fény elnyelésére. Fényabszorpció hiányában nem alakul ki a fitokrómok biológiailag aktív  $P_{fr}$  konformációja, amely a további jelátvitel alapvető feltétele.

## 8. SUMMARY

Phytochrome B (PHYB) is the dominant red/far-red light absorbing photoreceptor in light-grown *Arabidopsis* plants. PHYB provides signals to regulate photomorphogenesis, to control flowering and to entrain the circadian clock. Consequently, *phyB* mutants display long hypocotyls, accelerated flowering and long periods of circadian rhythms under specific light conditions. The PHYB receptor folds into two main domains: the chromophore-bearing photosensory N-terminal domain and the C-terminal domain containing a histidine kinase-like subdomain and protein motifs for dimerization and nuclear translocation. It has been demonstrated that dimers of the N-terminal domain of PHYB possess full PHYB function regarding photomorphogenesis and flowering time determination if they are targeted to the nucleus by added foreign NLS motifs. In other words, the histidine kinase domain is dispensable for these functions of PHYB and the main role of the C-terminal part is to provide a platform for dimerization and to control the entry of the protein in the nucleus.

In order to test the function of the N-terminal domain to provide light signaling to the circadian clock, we expressed the 651 aa N-terminal fragment fused to YFP, dimerization domains and NLS or NES protein motifs (B651-NLS and B651-NES, respectively) in the *phyB-9* background, which lacks any PHYB functions. The fusion proteins, including the YFP-tagged full length PHYB control (BFL) were expressed at comparable levels and showed the expected subcellular localization. The light input pathway to the circadian oscillator mediates two modes of entrainment depending on the duration of illumination. In constant light conditions, the activity of the input pathway shortens the free-running period length with increasing light intensity (parametric entrainment). In constant darkness, however, short light pulses elicit discrete phase advances or delays of the oscillator and overt circadian rhythms (non-parametric entrainment). Red light signals absorbed by PHYB contribute to both types of entrainment. We found that rhythmic expression of core oscillator genes has longer period in *phyB-9* plants compared to wild type in continuous red light at  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fluence rate. On the other hand, in absence of PHYB function, red light pulses trigger smaller phase shifts of the oscillator. Our results demonstrated that B651-NLS was as effective to restore these phenotypes of the *phyB-9* mutant as the full length PHYB. Interestingly, BFL (and B651-NLS) showed significant increase in the amplitude of mRNA rhythm of *CCA1*, but did not cause shorter periods. It has been reported that over-expression of PHYB results in short period of *CAB:LUC* expression in

continuous red light and in early flowering under both SD and LD conditions. The lack of circadian and flowering time phenotypes of BFL can be explained by similar PHYB levels in BFL and WT plants, in contrast to lines used in the cited studies, which show at least 15-fold over-expression of the PHYB protein. In contrast to BFL and B651-NLS, B651-NES was unable to restore PHYB function to regulate rhythmic *CCA1* or *TOC1* expression. These results demonstrate that the N-terminal domain of PHYB is capable to mediate all aspects of entrainment of the circadian clock and this function requires nuclear localization of PHYB. The data presented here also verify previous reports, since B651-NLS, but not B651-NES restored the photomorphogenic and flowering phenotypes of *phyB-9*.

The molecular mechanism by which nuclear localized PHYB mediates entrainment is unclear, but most likely involves interaction of PHYB with regulatory proteins, which indirectly or directly affect the oscillator. Among such clock-affecting proteins, ZEITLUPE (ZTL) and EARLY FLOWERING 3 (ELF3) have been shown to interact with PHYB in yeast or *in vitro*. ZTL is an F-box protein, which targets TOC1 proteins for ubiquitination by Skp1/Cullin/F-box (SCF) type E3 ubiquitin ligases and for subsequent degradation and severely affects the free-running period length. EARLY FLOWERING 3 (ELF3) is a clock-controlled nuclear protein, which attenuates light-induced resetting of the clock. However, both ZTL and ELF3 bind to the C-terminal domain of PHYB, which is dispensable for circadian function in red light according to our data; therefore, these interactions have no relevance to entrainment under these conditions.

In fact, PIF3 has been shown to interact with the N-terminal domain of PHYB P<sub>fr</sub> and also with TOC1. Since PIF3 potentially binds to the G-box element located in the promoter of *CCA1* and *LHY* genes, the PHYB-PIF3-TOC1 complex could provide a mechanism for directing regulatory light signals to certain core oscillator genes. It has been shown that PIF1, 4 and 5 also interact with TOC1. However, misexpression of PIF3 or PIF5 does not affect entrainment of the plant circadian clock. Although the lack of such phenotypes could be explained by possible redundant co-action of several PIF3-like transcription factors, PIFs are probably not the terminal components of PHYB-mediated red light input to the clock, but rather represent components of clock-controlled output processes (e.g. rhythmic hypocotyl elongation).

It has been reported that a short fragment containing 450 aa of the N-terminal domain of PHYB mediates photomorphogenic responses in the nucleus. We created *phyB-9* plants expressing this PHYB derivative in fusion with dimerization and NLS signals (B450-NLS). Analysis of these transgenic lines verified that the PHY subdomain of the N-

terminal part of PHYB is not required for the inhibition of hypocotyl elongation and revealed that this subdomain is also dispensable for the regulation of period length. We demonstrated that B450-NLS rescued the wild type expression pattern of *CCA1* and *TOC1*. Unlike the photomorphogenic and circadian phenotypes, the early flowering phenotype of *phyB-9* was not restored by B450-NLS. B450-NLS plants grown in long day (16h light / 8h dark) flowered at the same time as *phyB-9* mutants. This result is consistent with those reported earlier. This observation indicates that the PHY subdomain may provide a binding site for a yet unidentified factor, which is necessary to transmit signals eventually destabilizing CO protein and delaying flowering. The facts that PHYB acts on CO protein levels and that the flowering phenotype of *phyB* mutants is independent of photoperiods demonstrate that early flowering of *phyB* mutants does not arise from altered clock function. Our results further support this conclusion, because B450-NLS plants generate wild type circadian rhythms, yet display the early flowering phenotype of *phyB-9*.

In order to define the minimal N-terminal PHYB fragment, which is still functional in the nucleus, we created transgenic plants expressing a 410 aa derivative of PHYB (B410-NLS). Despite the fact that this version is only 40 aa shorter than B450-NLS, B410-NLS was unable to complement any phenotypes of *phyB-9* in any assays. It must be noted that the effect of both B651-NLS and B450-NLS was light dependent and phenotypes indicating constitutive light-independent signaling were not observed in these plants in darkness. This means that light-induced conformational change is a prerequisite of the biological function of these derivatives. In order to undergo  $P_r \leftrightarrow P_{fr}$  conversions, the chromophore must be attached to the PHYB apoprotein. Zn-blots were used to test the chromophore binding capability of the different PHYB derivatives. We provided evidence that B651 and B450 were able to autoligate the chromophore. In contrast, B410 failed to incorporate the chromophore, indicating that the deletion probably affected the function of the bilin lyase domain.

Quantitative analysis of clock gene expression in the *phyB-9* mutant revealed an unexpected complexity in the function of the light input to the circadian oscillator. The plant oscillator consists of three interlocked transcriptional/translational feedback loops. The “morning” loop is operated by interactions among *CCA1/LHY* and *PRR7/9* genes, the “evening” loop is based on the cross-regulation between *TOC1* and *YGI* and the two loops are coupled by a central loop formed by *CCA1/LHY*, *TOC1* and a yet unidentified X factor. In wild type plants these loops are coupled together, which is illustrated by stable and constant phase relationships of expression of these genes under free-running conditions.

Theoretically, the morning and evening loops could be uncoupled from each other in certain conditions, for example as a result of miss-function of X. Our data demonstrated that loss of PHYB function affect the pace of the morning and evening loops differently. Expression of *CCA1* and *PRR9*, components of the morning loop, show significant long period rhythm in *phyB-9* over a wide range of fluence rates of continuous red light, but *TOC1* and *GI* expression display less significant period lengthening. Importantly, at lower fluences of red light, the pace of the evening loop is not affected by the lack of *phyB-9*, whereas the morning loop runs at a lower pace in the same conditions. These data demonstrate that in these conditions the coupling between the morning and evening loops has been weakened in *phyB-9*. Although the exact molecular mechanism of this phenomenon and the role of PHYB in the apparent decoupling remain unclear, our results shed light on the complexity of the function of the light input to the plant circadian oscillator. This complexity was further expanded by the analysis of circadian gene expression in the *phyB-9* mutant in continuous white light. Our data showed that PHYB has nearly opposite effects on the pace of the clock in red and white light, since circadian period lengths in the *phyB-9* mutant are generally lengthened or shortened in continuous red or white light conditions, respectively. On the other hand, it has been demonstrated that the *phyB-1* mutation has no effect on period length in monochromatic blue light. The cool white fluorescent tubes used in this experiment provide light enriched in blue light, but still emit red light capable of PHYB activation. This is indicated by the long hypocotyls of *phyB-9* seedlings under this condition. It follows that the short period phenotype *phyB-9* is apparent upon simultaneous activation of the red and blue light signaling pathways to the clock, which could be explained by a negative effect of PHYB on blue light signaling. The unexpected short period phenotype in continuous white light has been observed for leaf-movement rhythms in the quintuple phy mutant, also suggesting that blue light input to the clock is attenuated by the action of phytochrome(s). Since PHYB appears to have a positive effect on CRY2 signaling, other routes of blue light input may be affected. However, molecular details of this particular functional interaction between red and blue light signaling to the clock remain to be elucidated. We showed that BFL, but not B651-NLS was able to complement the short period phenotype of *phyB-9* in white light. Since the BFL and B651-NLS proteins were expressed at similar levels, the lack of complementation by B651-NLS is most probably due to absence of the C-terminal domain of PHYB.

In conclusion, our data suggest that the nuclear localized N-terminal domain of PHYB is fully functional in regulating photomorphogenesis, flowering time and red light-dependent entrainment of the circadian clock. However, the C-terminal domain is essential for proper circadian entrainment in white light conditions. To explain the requirement of the C-terminal domain for this process, we propose that this domain mediates integration of the blue and red light signaling pathways to the clock.



## 9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A dolgozat anyagából megjelent publikáció:

**Palágyi, A.**, Terecskei, K., Ádám, É., Kevei, É., Kircher, S., Mérai, Zs., Schäfer, E., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2010) Functional analysis of amino-terminal domains of the photoreceptor phytochrome B. *Plant Physiology* 153, 1834-1845

### Egyéb publikációk:

1. Palágyi, A., **Palágyi, A(ndrea)** (2007) GK Impala: új őszi zab fajta - 40 év után. *AgroNapló* 11. kötet, 10-11, 16
2. **Palágyi, A.**, Tóth, B., Mesterházy, Á. (2002) Examination of resistance of wheat cultivars against *Fusarium* infection. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49, 418-419
3. Tóth, B., Téren, J., **Palágyi, A.**, Varga, J., Mesterházy, Á. (2002) Examination of the molecular variability of *Fusarium culmorum* isolates. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 49, 388-389
4. Varga, J., Kevei, É., **Palágyi, A.**, Tóth, B., Kozakiewicz, Z. (2000) Analysis of genetic variability within the *Petromyces* genus. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 83-89
5. Téren, J., **Palágyi, A.**, Kevei, É., Varga, J. (1997) Isolation of variants of *Petromyces albertensis* with altered ochratoxin production. *Cereal Res. Commun.* 25, 305-306
6. Téren, J., **Palágyi, A.**, Varga, J. (1997) Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Res. Commun.* 25, 303-304
7. Varga, J., Kevei, É., **Palágyi, A.**, Téren, J. (1997) Genetic variability within the toxigenic *Petromyces* genus. *Cereal Res. Commun.* 25, 285-289

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad M, Cashmore AR** (1993) HY4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P, Kay SA** (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**: 880-883
- Alabadi D, Yanovsky MJ, Mas P, Harmer SL, Kay SA** (2002) Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **12**:757-761
- Bae G, Choi G** (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 281-311
- Bagnall DJ, King RW, Whitelam GC, Boylan MT, Wagner D, Quail PH** (1995) Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **108**: 1495-503.
- Bauer D, Viczian A, Kircher S, Nobis T, Nitschke R, Kunkel T, Panigrahi KC, Adam E, Fejes E, Schafer E, Nagy F** (2004) Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1433-1445
- Borland AM, Hartwell J, Jenkins GI, Wilkins MB, Nimmo HG** (1999) Metabolite control overrides circadian regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and CO<sub>2</sub> fixation in Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol* **121**: 889-896
- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua NH** (1994a) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81
- Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G, Chua NH** (1994b) Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* **8**: 2188-2202
- Briggs WR, Beck CF, Cashmore AR, Christie JM, Hughes J, Jarillo JA, Kagawa T, Kanegae H, Liscum E, Nagatani A, Okada K, Salomon M, Rudiger W, Sakai T, Takano M, Wada M, Watson JC** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**: 993-997
- Bünning E** (1935) Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den Primärblättern von *Phaseolus multiflorus*. *Jahrbuch für Wissenschaftliche Botanik* **81**:411-418

- Carre IA, Kim JY** (2002) MYB transcription factors in the *Arabidopsis* circadian clock. *J Exp Bot* **53**: 1551-1557
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**: 760-765
- Chen M, Chory J, Frankhauser C** (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**: 87-117
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR** (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8779-8783
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743
- Clough RC, Viestra RD** (1997) Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ* **20**: 713-721
- Covington MF, Panda S, Liu XL, Strayer CA, Wagner DR, Kay SA** (2001) ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1305-1315
- Crosthwaite SK, Loros JJ, Dunlap JC** (1995) Light induces resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell*, **81**: 1001-1012
- Deng X-W, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH** (1992) COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G $\beta$  homologous domain. *Cell* **50**: 1001-1010
- Devlin PF, Kay SA** (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**: 2499-2510
- Devlin PF, Kay SA** (2001) Circadian photoperception. *Annual Review of Physiology* **63**: 677-694
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognar L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM** (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **419**: 74-77
- Dowson-Day MJ, Millar AJ** (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* **17**: 63-71
- Edmunds LN** (1988) *Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks*. Springer-Verlag New York

- Edwards KD, Lynn JR, Gyula P, Nagy F, Millar AJ** (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Genetics* **170**: 387-400
- Endo M, Mochizuki N, Suzuki T, Nagatani A** (2007) CRYPTOCHROME2 in vascular bundles regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 84-93
- Endo M, Nakamura S, Araki T, Mochizuki N, Nagatani A** (2005) Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell* **17**: 1941-1952
- Engelmann W, Johnsson A** (1998) Rhythms in organ movement. In Lumsden PJ, Millar AJ, eds *Biological rhythms and photoperiodism in plants*. Oxford Bios Scientific
- Engelmann W, Simon K, Phen CJ** (1994) Leaf movement in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift für Naturforschung* **47**: 925-928
- Fankhauser C, Chen M** (2008) Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends in Plant Science* **13**: 596-601
- Fankhauser C, Yeh K-C, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J** (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 1539-1541
- Fankhauser C, Chory J** (1997) Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 203-229
- Farré EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA** (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Current Biology* **15**: 47-54
- Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J** (1999) GIGANTEA: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several membrane-spanning domains. *EMBO J* **18**: 4679-4688
- Franklin KA, Quail PH** (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany* **61**: 11-24
- Fujimori T, Yamashino T, Kato T, Mizuno T** (2004) Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1078-1086
- Furuya M, Schafer E** (1996) Photoperception and signaling of induction reactions by different phytochromes. *Trends Plant Sci* **1**: 301-307

- Gorlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S** (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Current Biology* **5**: 383-392
- Green RM, Tobin EM** (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4176-4179
- Gressel J** (1977) Blue light photoreception. *Photochem Photobiol* **30**: 749-754
- Hall A, Kozma-Bognar L, Bastow RM, Nagy F, Millar AJ** (2002) Distinct regulation of CAB and PHYB gene expression by similar circadian clocks. *Plant Journal* **32**: 529-537
- Hardtke CS, Gohda K, Osterlund MT, Oyama T, Okada K, Deng XW** (2000) HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* **19**: 4997-5006
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang H-S, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113
- Harmer SL, Panda S, Kay SA** (2001) Molecular bases of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 215-53
- Harmer SL** (2009) The circadian system in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 357-377
- Harter K, Kircher S, Frohnmeyer H, Krenz M, Nagy F, Schäfer E** (1994) Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. *Plant Cell* **6**: 545-559
- Hicks KA, Millar AJ, Carre IA, Somers DE, Straume M, Meeks-Wagner DR, Kay SA** (1996) Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* early-flowering 3 mutant. *Science* **274**: 790-792
- Highkin HR, Hanson JB** (1954) Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. *Plant Phys* **29**: 301-302
- Hoffman PD, Batschauer A, Hays JB** (1996) PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol Gen Genet* **253**: 259-265
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR** (1997) *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**: 2120-2123

- Imaizumi T, Kay SA** (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science* **11**: 550-558
- Ito S, Matsushika A, Yamada H, Sato S, Kato T, Tabata S, Yamashino T, Mizuno T** (2003) Characterization of the APRR9 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44**: 1237-1245
- Jansen MAK** (2002) Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum* **116**: 423-429
- Jarillo JA, Capel J, Tang RH, Yang HQ, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both CRY1 and phyB. *Nature* **410**: 487-490
- Jenkins GI** (1997) UV and blue light signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **20**(6): 773-778
- Johnson PH** (1990) PRC Atlas.  
<http://johnsonlab.biology.vanderbilt.edu/prcatlas6prcatlas.html>
- Johnson CH, Knight M, Trewavas A, Kondo T** (1998) A clockwork green: circadian programs in photosynthetic organisms. In Lumsden PJ, Miller AJ, eds *Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants*. BIOS Scientific Publishers Oxford 1-34
- Kaczorowski KA, Quail PH** (2003) *Arabidopsis* PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 is a signaling intermediate in phytochrome-regulated seedling deetiolation and phasing of the circadian clock. *Plant Cell* **15**: 2654-2665
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509
- Kenigsbuch D, Tobin EM** (1995) A region of the *Arabidopsis* Lhcb\*3 promoter that binds to CA-1 activity is essential for high expression and phytochrome regulation. *Plant Phys* **108**: 1023-1027
- Kevei E, Gyula P, Feher B, Toth R, Viczian A, Kircher S, Rea D, Dorjgotov D, Schafer E, Millar AJ, Kozma-Bognar L, Nagy F** (2007) *Arabidopsis thaliana* circadian clock is regulated by the small GTPase LIP1. *Current Biology* **17**: 1456-1464
- Kevei E, Gyula P, Hall A, Kozma-Bognar L, Kim WY, Eriksson ME, Toth R, Hanano S, Feher B, Southern MM, Bastow RM, Viczian A, Hibberd V, Davis SJ, Somers DE, Nagy F, Millar AJ** (2006) Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of ZEITLUPE. *Plant Physiol* **140**: 933-945

- Khanna R, Kikis EA, Quail PH** (2003) EARLY FLOWERING 4 Functions in Phytochrome B-Regulated Seedling De-Etiolation. *Plant Phys* **119**: 1530-1538
- Kim WY, Geng R, Somers DE** (2003) Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4933-4938
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schafer E, Nagy F** (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**: 1541-1555
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schäfer E, Nagy F** (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* **11**: 1445-1456
- Kircher S, Wellmer F, Nick P, Rügner A, Schafer E, Harter K** (1999) Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J Cell Biol* **144**: 201-211
- Kircher S, Ledger S, Hayashi H, Weisshaar B, Schäfer E, Frohnmeyer H** (1998) CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Molecular and General Genetics* **257**: 595-605
- Koncz C, Martini N, Szabados L, Hrouda M, Bachmair A, Schell J** (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In *Plant Molecular Biology Manual*, Gelvin BS, Schilperoot RA, eds Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 1-22
- Koornneef M, Rolff E, Spruit CPJ** (1980) Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh *Z Pflanzenphysiol* **100**: 147-160
- Kozma-Bognar L, Kaldi K** (2008) Synchronization of the fungal and the plant circadian clock by light. *Chembiochem* **9**: 2565-2573
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129-2141
- Kreps JA, Kay SA** (1997) Coordination of Plant Metabolism and Development by the Circadian Clock. *Plant Cell* **9**: 1235-1244

- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Gorlich D** (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-1071
- Lagarias JC, Lagarias DM** (1989) Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5778-5780
- Lim RY, Fahrenkrog B** (2006) The nuclear pore complex up close. *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 342-347
- Lin C, Todo T** (2005) The cryptochromes. *Genome Biol* **6**: 220
- Lin C, Shalitin D** (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 469-496
- Lin C** (2002) Phototropin blue light receptors and light-induced movement responses in plants. *Sci STKE* **118**: PE5
- Lin C** (2000) Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* **5**: 337-342
- Lin CT, Yang HY, Guo HW, Mockler T, Chen J, Cashmore AR** (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2686-2690
- Lin C, Ahmad M, Cashmore AR** (1996) *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J* **10**: 893-902
- Liscum E, Briggs WR** (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* **7**: 473-485
- Liu XL, Covington MF, Fankhauser C, Chory J, Wagner DR** (2001) ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* **13**: 1293-1304
- Locke JC, Kozma-Bognar L, Gould PD, Feher B, Kevei E, Nagy F, Turner MS, Hall A, Millar AJ** (2006) Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* **2**: 59
- Locke JC, Southern MM, Kozma-Bognar L, Hibberd V, Brown PE, Turner MS, Millar AJ** (2005) Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0013
- Lumsden PJ, Youngs JA, Thomas B, Vinceprue D** (1995) Evidence that photoperiodic, dark time measurement in *Pharbitis nil* involves a circadian rather than a semidian rhythm. *Plant Cell Environ* **18**:1403-1410



- Lumsden PJ** (1991) Circadian rhythms and phytochrome. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 351-371
- de Marian J** (1729) Observation botanique. *Hisorie de l'Academie Royale des Sciences* 35-36
- Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**: 859-863
- Mas P, Devlin PF, Panda S, Kay SA** (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**: 207-211
- Mas P, Kim WY, Somers DE, Kay SA** (2003) Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **426**: 567-570
- Mas P, Yanovsky MJ** (2009) Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 574-579
- Matsushika A, Makino S, Kojima M, Mizuno T** (2000) Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators: Insight into the plant circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **41**:1002-1012
- Matsushika A, Imamura A, Yamashino T, Mizuno T** (2002) Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated APRR9 gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **43**: 833-843
- Matsushita T, Mochizuki N, Nagatani A** (2003) Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**: 571-574
- McWatters HG, Bastow RM, Hall A, Millar AJ** (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* **408**:716-720
- Merkle T** (2003) Nucleo-cytoplasmic partitioning of proteins in plants: implications for the regulation of environmental and developmental signalling. *Current Genetics* **44**: 231-260
- Merrow MW, Garceau NY, Dunlap JC** (1997) Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3877-3882
- Millar AJ** (2003) A suite of photoreceptors entrains the plant circadian clock. *Journal of Biological Rhythms* **18**: 217-226
- Millar AJ, Carré IA, Strayer CA, Chua N-H, Kay SA** (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* **267**: 1161-1163
- Millar AJ, Kay SA** (1991) Circadian Control of cab Gene Transcription and mRNA Accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 1075-1087

- Mitsui A, Kumazawa S, Takahashi A, Ikemoto H, Arai T** (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**: 720-722
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carre IA, Coupland G** (2002) LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **2**: 629-641
- Mizuno T** (1998) His-Asp phosphotransfer signal transduction. *J Biochem* **123**: 555-563
- Montgomery BL, Lagarias JC** (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends in Plant Science* **7**: 357-366
- Murakami M, Yamashino T, Mizuno T** (2004) Characterization of circadian-associated APRR3 pseudo-response regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **45**: 645-650
- Nagy F, Kircher S, Schafer E.** (2000) Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochromes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **11**: 505-510
- Nagy F, Kircher S, Schafer E.** (2001) Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *Journal of Cell Science* **114**: 475-480
- Nagy F, Schafer E.** (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 329-355
- Neff MM, Chory J** (1998) Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* **118**: 27-35
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH** (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-667
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN** (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**: 358-361
- Oka Y, Matsushita T, Mochizuki N, Suzuki T, Tokutomi S, Nagatani A** (2004) Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2104-2116
- Osterlund MT, Wei N, Deng XW** (2000) The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol* **124**: 1520-1524

- Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG** (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene. *Science* **285**: 1579- 1582
- Park CM, Bhoo SH, Song PS** (2000) Inter-domain crosstalk in the phytochrome molecules. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **11**: 449-456
- Pfeiffer A, Kunkel T, Hiltbrunner A, Neuhaus G, Wolf I, Speth V, Adam E, Nagy F, Schafer E** (2009) A cell-free system for light-dependent nuclear import of phytochrome. *Plant Journal* **57**: 680-689
- Pilgrim ML, McClung RC** (1993) Differential involvement of the circadian clock in the expression of genes required for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase synthesis, assembly and activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **103**: 553-564
- Plautz JD, Straume M, Stanewsky R, Jamison CF, Brandes C, Dowse HB, Hall JC, Kay SA** (1997) Quantitative analysis of *Drosophila* period gene transcription in living animals. *J Biol Rhythms* **12**: 204-217
- Quail PH** (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* **140**: 180-188
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**: 147-157
- Ribbeck K, Gorlich D** (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *The EMBO Journal* **20**: 1320-1330
- Robson F, Costa MM, Hepworth SR, Vizir I, Pineiro M, Reeves PH, Putterill J, Coupland G** (2001) Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene CONSTANS demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J* **28**: 619-631
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC** (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 837-858
- Roenneberg T, Foster RG** (1997) Twilight times: light and the circadian system. *Photochemistry and Photobiology* **66**: 549-561

- Romero I, Fuertes A, Benito MJ, Malpica JM, Leyva A, Paz-Ares J** (1998) More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14**: 273-284
- Sakamoto K, Nagatani A** (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *The Plant Journal* **10**: 859-868
- Salome PA, Michael TP, Kearns EV, Fett-Neto AG, Sharrock RA, McClung CR** (2002) The out of phase 1 mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 1674-1685
- Salome PA, McClung CR** (2004) The *Arabidopsis thaliana* clock. *J Biol Rhythms* **19**: 425-435
- Salome PA, McClung CR** (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* **17**: 791-803
- Sambrook J, Fritsch FE, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sato E, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T** (2002) Aberrant expression of the *Arabidopsis* circadian-regulated APRR5 gene belonging to the APRR1/TOC1 quintet results in early flowering and hypersensitiveness to light in early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* **43**: 1374-1385
- Schäfer E, Marchal B, Marme D** (1972) In vivo measurements of phytochrome photostationary state in far-red light. *Photochem Photobiol* **15**: 457-464
- Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E** (2001) Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 113-123
- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G** (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**:1219-1229
- Schneider-Poetsch HAW, Braun B, Marx S, Schaumburg A** (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. *FEBS Lett* **281**: 245-249
- Sharrock RA, Quail PH** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* **3**: 1745-1757

- Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM, Quail PH** (2002) A light-switchable gene promoter system. *Nature Biotechnology* **20**: 1041-1044
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA** (1998) Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **282**: 1488-1490
- Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA** (2000) ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* **101**: 319-329
- Somers DE** (2001) Clock-associated genes in *Arabidopsis*: a family affair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 1745-1753
- Song P-S** (1999) Inter-Domain Signal Transmission within the Phytochromes. *J Biochem Mol Biol.* 32: 215-225
- Southern MM, Millar AJ** (2005) Circadian genetics in the model higher plant, *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol* **393**: 23-35
- Stapleton AE** (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* **4**: 1353-1358
- Stoffler D, Fahrenkrog B, Aebi U** (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* **11**: 391-401
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B** (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447-456
- Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD** (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 4776-4781
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA** (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**: 768-771
- Sugano S, Andronis C, Green RM, Wang ZY, Tobin EM** (1998) Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11020-11025
- Sugano S, Andronis C, Org MS, Green RM, Tobin EM** (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1362-1366
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Baurle I, Kudla J, Nagy F, Schafer E, Harter K** (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* **294**: 1108-1111

- Teramura A** (1996) How plants respond to a changing UV-B radiation environment. In Regulation of Plant Growth and Development by Light. Briggs WR, Heath RL, Tobin EM eds Am Soc Plant Physiol Rockville MD USA 164-170
- Terzaghi WB, Cashmore AR** (1995) Light-regulated transcription. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **46**: 445-474
- Thomas B** (1998) Photoperiodism: an overview. In Lumsden PJ, Millar AJ eds Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants. Bios Scientific Publishers Oxford 151-165
- Thomas B, Vince-Prue D** (1996) Photoperiodism in Plants. Academic Press London
- Toth R, Kevei E, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognar L** (2001) Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. Plant Physiol **127**: 1607-1616
- Tran EJ, Wente SR** (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. Cell **125**: 1041-1053
- Trupkin SA, Debrieux D, Hiltbrunner A, Fankhauser C, Casal JJ** (2007) The serine-rich N-terminal region of *Arabidopsis* phytochrome A is required for protein stability. Plant Molecular Biology **63**: 669-678
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G** (2004) Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. Science **303**: 1003-1006
- Viczian A, Kircher S, Fejes E, Millar AJ, Schafer E, Kozma-Bognar L, Nagy F** (2005) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 for the *Arabidopsis thaliana* circadian clockwork. Plant and Cell Physiology **46**: 1591-1602
- Wang ZY, Tobin EM** (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell **93**: 1207-1217
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS** (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. Cell **82**: 463-473
- Went FW** (1960) Photo- and thermoperiodic effects in plant growth. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol **25**: 221-230
- Whitelam GC, Devlin PF** (1997) Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* development. Plant Cell Environ **20**: 752-758
- Wu SH, Lagarias JC** (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. Biochemistry **39**: 13487-13495

- Yamashino T, Matsushika A, Fujimori T, Sato S, Kato T, Tabata S, Mizuno T** (2003) A Link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **44**: 619-629
- Yamamoto Y, Sato E, Shimizu T, Nakamichi N, Sato S, Kato T, Tabata S, Nagatani A, Yamashino T, Mizuno T** (2003) Comparative genetic studies on the APRR5 and APRR7 genes belonging to the APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1119-1130
- Yanovsky MJ, Mazzella MA, Whitelam GC, Casal JJ** (2001) Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Rhythms* **16**: 523-530
- Yasuhara M, Mitsui S, Hirano H, Takanabe R, Tokioka Y, Ihara N, Komatsu A, Seki M, Shinozaki K, Kiyosue T** (2004) Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein 2) in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot* **55**: 2015-2027
- Yeh K-C, Lagarias JC** (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13976-13981
- Young MW, Kay SA** (2001) Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet* **2**: 702-715
- Zagotta MT, Hicks KA, Jacobs CI, Young JC, Hangarter RP, Meeks-Wagner DR** (1996) The *Arabidopsis* ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J* **10**: 691-702

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatban bemutatott kísérleteket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központjának Növénybiológiai Intézetében, a Foto- és Kronobiológiai Csoport tagjaként végeztem el.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kozma-Bognár Lászlónak az elmúlt 5 évben nyújtott felbecsülhetetlen szakmai és erkölcsi támogatásáért, és türelméért. Köszönöm a segítségét és tanácsait a dolgozatom megírásához. Hálás vagyok csoportvezetőmnek, Dr. Nagy Ferencnek az anyagi és szellemi támogatásáért, amellyel mindvégig segítette a munkámat. Köszönöm Dr. Dudits Dénes, volt főigazgató és Dr. Vass Imre igazgató uraknak, hogy munkámat lehetővé tették.

Köszönettel tartozom a Foto- és Kronobiológiai csoport minden egyes tagjának a munkám során nyújtott segítségükért és a közvetlen munkahelyi légkör megteremtéséért. Köszönöm Dr. Kevei Évának az önzetlen szakmai segítségét a munkám kezdeti időszakában. Köszönet illeti Jószai Katalin, Majzik Hedvig és Veres Gabriella aszisztenseinket a kísérletek előkészületeiben nyújtott nélkülözhetetlen munkájukért. Külön köszönöm özv. Hajó Róbertné Mártinak az *Arabidopsis* magok tisztításában végzett munkáját. Hálásan köszönöm Dr. Ádám Éva, Terecskei Kata, Fehér Balázs és Dr. Gyula Péter munkatársaimnak a szakmai támogatást és a mérések során nyújtott, fáradságot nem kímélő segítséget.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak a munkámat végigkísérő biztatásért és támogatásért.